

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Anđelka S. Račić

**POLISAHARIDNI MUKOADHEZIVNI
VEHIKULUMI KAO NOSAČI ZA
LEKOVITE SUPSTANCE IZ GRUPE
ANTIHISTAMINIKA ZA OFTALMOLOŠKU
PRIMENU**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Anđelka S. Račić

**POLISAHARIDNI MUKOADHEZIVNI
VEHIKULUMI KAO NOSAČI ZA
LEKOVITE SUPSTANCE IZ GRUPE
ANTIHISTAMINIKA ZA OFTALMOLOŠKU
PRIMENU**

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Andelka S. Račić

**POLYSACCHARIDE MUCOADHESIVE
VEHICLES AS CARRIERS FOR
ANTIHISTAMINIC DRUGS FOR
OPHTHALMIC APPLICATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR

Dr sc. Danina Krajišnik, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, predsednik

Dr sc. Bojan Čalija, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Sonja Vučen, docent, Univerzitet u Korku, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Ana Micoč, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Izrada ove doktorske disertacije realizovana je na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta; deo eksperimentalnog rada urađen je na Katedri za farmakologiju i Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, Zavodu za tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu – Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i na Farmaceutskom fakultetu u Korcu (Irska).

Na kraju dugog puta koji završava uspješno ovom doktorskom disertacijom, želim da se zahvalim svim dragim ljudima koji su bili uz mene sve ove godine i svojim direktnim ili indirektnim učesćem doprinijeli nastanku ove doktorske disertacije.

Prije svega, zahvaljujem se svojoj dragoj mentorki prof. dr Danini Krajišnik na svemu što mi je pružila proteklih godina tokom mojih doktorskih studija. Zahvaljujem joj se na nesebičnoj pomoći, idejama, uloženom trudu, posvećenosti i požrtvovanosti, satima i satima provedenim pored reometra.

Zahvaljujem se dragoj prof. dr Snežani Savić na neizmjerne podršci tokom izrade ove doktorske disertacije, na svim podijeljenim korisnim savjetima, razmišljanjima, srdačnosti i svemu što sam od nje naučila.

Zahvaljujem se dragom prof. dr Bojanu Čaliji, koji je bio uz mene od prvog ulaska u laboratoriju, na uvijek prijateljskoj dobrodošlici, podršci, ohrabrivanju, bezgraničnoj pomoći u eksperimentalnom radu i tehničkoj pripremi publikacija, svim sugestijama i idejama.

Zahvaljujem se dragoj dr. sc. Sonji Vučen, mojoj asistentici sa dodiplomskih studija, zbog čijeg sam rada, znanja i posvećenosti i zavoljela farmaceutsku tehnologiju. Zahvaljujem joj se na saradnji i nesebičnoj pomoći oko izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dragom prof. dr Vladimiru Dobričiću na uloženom vremenu, velikom trudu i posvećenosti tokom svih ovih godina zajedničke saradnje, što je bez pogovora prihvatao da analizira sve naše uzorke koje smo nekada brojali i u stotinama.

Zahvaljujem se dragoj dr. sc. Ani Micov na srdačnosti, sjajnim idejama, angažovanosti i velikoj pomoći oko sprovođenja eksperimenata i tumačenja rezultata koji predstavljaju značajan doprinos ove doktorske disertacije.

Takođe, zahvaljujem se svojoj prvoj mentorki, dragoj prof. dr Jeli Milić na svemu što mi je pružila, na divnoj saradnji, bezrezervnoj podršci, razumijevanju, prihvatanju i uvijek toploj dobrodošlici.

Želim da se zahvalim svojim dragim domaćinima na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, prof. dr Jasmini Lovrić i divnoj koleginici dr. sc. Biseri Jurišić-Dukovski na gostoprimstvu, uloženom trudu, radu i sjajnim idejama koje su značajno doprinijele ovoj doktorskoj disertaciji.

Veliko hvala mojim prijateljima i najdražim kolegama sa studijskog programa farmacija Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci koji su mi bili neizmjerne podrška i koji su proživljavali sa mnom sve teške i lijepe trenutke na ovom dugom putu.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, majci Radmili, ocu Slavku, bratu Stojanu što su bili uvijek uz mene i uvijek vjerovali u moj uspjeh, pomagali mi u svakom smislu i najvažnije, brinuli se o mojoj djeci dok sam odsutna.

Najveće HVALA upućujem svom suprugu Radiši, koji je sa mnom proživio svaki trenutak tokom studija. Hvala mu na strpljenju, neizmjerne podršci, ljubavi, požrtvovanju i posvećenosti našoj djeci. Hvala mojoj djeci, Dimitriju i Katarini, koji su mi davali najviše snage da sve prebrodim i stigmem do cilja.

POLISAHARIDNI MUKOADHEZIVNI VEHIKULUMI KAO NOSAČI ZA LEKOVITE SUPSTANCE IZ GRUPE ANTIHISTAMINIKI ZA OFTALMOLOŠKU PRIMENU

Sažetak

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj polisaharidnih, mukoadhezivnih oftalmoloških lubrikanasa/vehikuluma koji sadrže derivate celuloze, derivat guar gume, hitozan i natrijum-hijaluronat u kombinaciji ili pojedinačno, kao nosača za lekovite supstance iz grupe antihistaminika. Kombinacije polimera pokazale su sinergistički efekat na reološko i mukoadhezivno ponašanje izrađenih oftalmoloških vehikuluma koji poseduju potencijal za produženo zadržavanje u suznom filmu. Oftalmološki vehikulumi odgovarajućih fizičko-hemijskih i funkcionalnih karakteristika odabrani su za izradu kapi za oči sa model lekovitim supstancama (olopatadin i ketotifen).

Dobijeni rezultati potvrdili su kompatibilnost između model lekovitih supstanci i upotrebljenih polimera (hidroksipropil guar gume, hitozana srednje molekulske mase i natrijum-hijaluronata). Studije permeabilnosti uspešno su sprovedene primenom modela zasnovanih na HCE-T ćelijama i paralelnim veštačkim membranama (PAMPA). Potvrđena je sposobnost hitozana da poboljšava permeabilnost kroz model rožnjače, dok se potencijalna uloga hidroksipropil guar gume i natrijum-hijaluronata ogledala u produžavanju vremena kontakta sa rožnjačom. Biokompatibilnost ispitivanih formulacija potvrđena je izvođenjem MTT citotoksičnog testa na HCE-T ćelijskom modelu. Procena efikasnosti kapi za oči koje sadrže kombinacije polisaharidnih polimera kao nosača za olopatadin i ketotifen sprovedena je u testu svraba oka izazvanog histaminom na miševima (model akutnog alergijskog konjunktivitisa). Ispitivani polimeri doprineli su dužem zadržavanju lekovitih supstanci na površini oka zahvaljući povećanju viskoziteta i dobrim mukoadhezivnim svojstvima, kao i poboljšanoj permeabilnosti, što je doprinelo dužem trajanju i povećanju intenziteta antipruritusnog dejstva, u odnosu na kapi za oči koje u sastavu ne sadrže polisaharidne polimere.

Ključne reči: polisaharidni polimeri, mukoadhezivnost, oftalmološki vehikulumi, olopatadin, ketotifen, permeabilnost, biokompatibilnost, *in vitro* ćelijski modeli, *in vivo* okularni test svraba

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

POLYSACCHARIDE MUCOADHESIVE VEHICLES AS CARRIERS FOR ANTIHISTAMINIC DRUGS FOR OPHTHALMIC APPLICATION

Abstract

The aim of this study was development of viscous polysaccharide, mucoadhesive lubricants/ophthalmic vehicles containing cellulose derivatives (hypromellose and hydroxyethylcellulose), derivative of guar gum, chitosan and sodium hyaluronate alone or in combination. Combinations of polymers exhibited synergistic effects on rheological and mucoadhesive behavior of the compounded ophthalmic vehicles. The compounded lubricants showed potential for a prolonged retention time in tear film. Ophthalmic vehicles with appropriate physicochemical properties and functionality were selected for the further formulation of eye drops with antihistaminic model drugs (olopatadine and ketotifen).

The obtained results revealed compatibility between model drugs and the polymers (hydroxypropyl guar gum, medium molecular weight chitosan, sodium hyaluronate). The drug permeability studies were successfully performed using HCE-T cell based models and the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA). Permeability enhancing property of chitosan was confirmed, while the potential role of hydroxypropyl guar gum and sodium hyaluronate was in prolonging of a contact time with the cornea. The MTT cytotoxicity assay performed on HCE-T cell based confirmed the biocompatibility of the tested formulations. The effectiveness of eye drops containing combinations of polysaccharide polymers was evaluated in a test of ocular itching induced by histamine in mice (model of acute allergic conjunctivitis). The investigated polymers improved drugs retention at the eye surface due to increased viscosity and good mucoadhesive properties, and improved permeability as well, which resulted in a more prolonged and pronounced anti-pruritic effect, in comparison with the aqueous solutions without polysaccharide polymers.

Keywords: polysaccharide polymers, mucoadhesiveness, ophthalmic vehicles, olopatadine, ketotifen, permeability, biocompatibility, *in vitro* cell models, *in vivo* ocular itch test

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical technology

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	TEORIJSKI ASPEKTI OFTALMOLOŠKE PRIMENE LEKOVA	3
1.1.1	Građa oka	3
1.1.2	Anatomske i fiziološke barijere oka	5
1.1.2.1	Lučenje i drenaža suza	6
1.1.3	Farmakokinetika lokalno aplikovanih lekova	7
1.2	METODE ZA PREVAZILAŽENJE PROBLEMA NISKE OKULARNE RASPOLOŽIVOSTI	9
1.2.1	Primena polimera kao sredstava za povećanje viskoziteta	9
1.2.1.1	Derivati celuloze	11
1.2.1.2	Hitozan	12
1.2.1.3	Natrijum-hijaluronat	14
1.2.1.4	Hidroksipropil guar guma	16
1.2.2	Upotreba pojačivača penetracije	18
1.3	SINDROM SUVOG OKA I ALERGIJSKI KONJUNKTIVITIS	18
1.4	MODEL LEKOVITE SUPSTANCE	21
1.4.1	Antihistaminici u terapiji sindroma suvog oka i alergijskog konjunktivitisa	21
1.4.1.1	Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba ketotifen-hidrogenfumarata	22
1.4.1.2	Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba olopatadin-hidrohlorida	23
1.5	METODE KARAKTERIZACIJE OFTALMOLOŠKIH PREPARATA	24
2.	CILJ RADA	4
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	8
3.1	MATERIJALI	35
3.2	METODE	37
3.2.1	Prva faza eksperimentalnog rada	37
3.2.1.1	Izrada vehikuluma sa lubrikantnim svojstvima	37
3.2.1.2	Izgled i bistrina	39
3.2.1.3	Merenje pH vrednosti	39
3.2.1.4	Merenje osmolalnosti	39
3.2.1.5	Određivanje molekulske mase polimera	39
3.2.1.6	Tenziometrijsko merenje površinskog napona	41
3.2.1.7	Reološka karakterizacija	41
3.2.1.8	Preliminarno ispitivanje stabilnosti vehikuluma nakon sterilizacije parom i perioda čuvanja od 28 dana	42
3.2.1.9	Statistička analiza	42
3.2.1.10	Ispitivanje mukoadhezivnih karakteristika primenom <i>in vitro</i> metoda	42
3.2.2	Druga faza eksperimentalnog rada	43
3.2.2.1	Izrada kapi za oči sa model lekovitim supstancama	44
3.2.2.2	Ispitivanje potencijalnih interakcija u smeši lekovite supstance i polimera	45

3.2.2.3	Fizičko-hemijska karakterizacija kapi za oči sa OLO i KF	45
3.2.2.4	Merenje površinskog napona i kontaktnog ugla	45
3.2.2.5	Uslovi uzgoja HCE-T ćelija i kultivacija <i>in vitro</i> ćelijskih modela	46
3.2.2.6	Studija permeabilnosti na HCE-T ćelijskim modelima	48
3.2.2.7	Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA)	49
3.2.2.8	Ispitivanje stabilnosti	50
3.2.2.9	Određivanje sadržaja lekovitih supstanci	50
3.2.2.10	Statistička analiza	51
3.2.3	Treća faza eksperimentalnog rada	51
3.2.3.1	Procena biokompatibilnosti ispitivanih formulacija	51
3.2.3.2	<i>In vivo</i> studija procene efikasnosti odabranih formulacija kapi za oči	51
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	55
4.1	Rezultati prve faze eksperimentalnog rada	57
4.1.1	Fizičko-hemijska karakterizacija vehikuluma	57
4.1.2	Merenje molekulske mase polimera	60
4.1.3	Reološka karakterizacija izrađenih vehikuluma i poredbenih komercijalnih preparata	60
4.1.3.1	Reološko ponašanje ispitivanih vehikuluma pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima	60
4.1.3.2	Ispitivanje uticaja sterilizacije parom i perioda čuvanja od 28 dana na fizičko-hemijske karakteristike odabranih vehikuluma	69
4.1.4	Površinski napon	71
4.1.5	Ispitivanje mukoadhezivnih karakteristika	72
4.1.5.1	Turbidimetrijska metoda	72
4.1.5.2	Metoda zasnovana na promenama zeta potencijala	74
4.1.5.3	Kontinualna i oscilatorna reološka analiza smeša vehikuluma i mucina	75
4.2	Rezultati druge faze eksperimentalnog rada	79
4.2.1	Izrada i fizičko-hemijska karakterizacija kapi za oči sa model lekovitim supstancama	79
4.2.2	Ispitivanje potencijalnih interakcija u smeši lekovite supstance i polimera	84
4.2.2.1	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. <i>Differential scanning calorimetry</i> , DSC)	84
4.2.2.2	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (engl. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> , FT-IR)	88
4.2.3	Površinski napon i kontaktni ugao	93
4.2.4	Studija permeabilnosti na HCE-T ćelijskim modelima	95
4.2.5	Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (engl. <i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i> , PAMPA)	102
4.2.6	Ispitivanje stabilnosti kapi za oči sa model lekovitim supstancama	103
4.3	Rezultati treće faze eksperimentalnog rada	109
4.3.1	Procena biokompatibilnosti ispitivanih formulacija	109
4.3.2	Rezultati <i>in vivo</i> studije procene efikasnosti formulisanih kapi za oči	111
5.	ZAKLJUČAK	115

6.	LITERATURA	121
7.	PRILOZI	135
7.1	Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije	137
8.	BIOGRAFIJA	139
8.1	Biografija autora	141
9.	IZJAVE	143
9.1	Izjava o autorstvu	145
9.2	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada	146
9.3	Izjava o korišćenju	147

1. UVOD

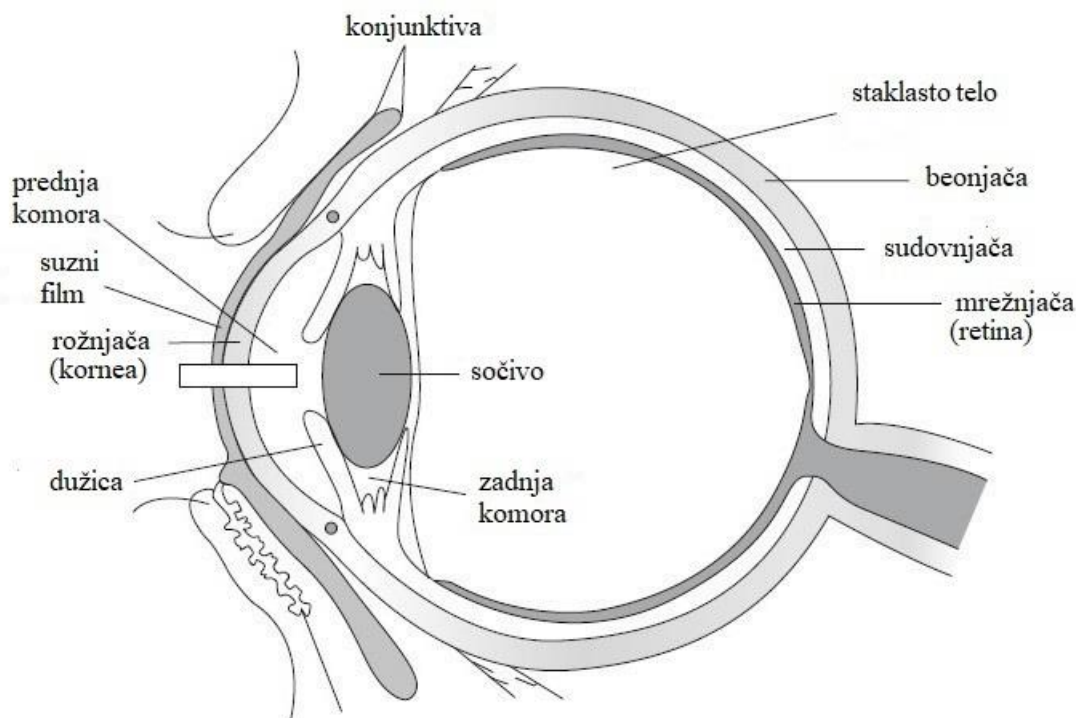
1.1 TEORIJSKI ASPEKTI OFTALMOLOŠKE PRIMENE LEKOVA

1.1.1 Građa oka

Ljudsko oko je jedan od najkompleksnijih delova tela (slika 1.1). Oko je anatomski podeljeno u dva segmenta:

(1) prednji segment koji se sastoji od rožnjače (kornea), konjunktive, dužice, zenice, prednje i zadnje komore ispunjenih očnom vodicom, trabekularne mreže i sočiva;

(2) zadnji segment oka sastoji se od beonjače, sudovnjače, mrežnjače, staklastog tela, slepe mrlje i optičkog nerva [1].

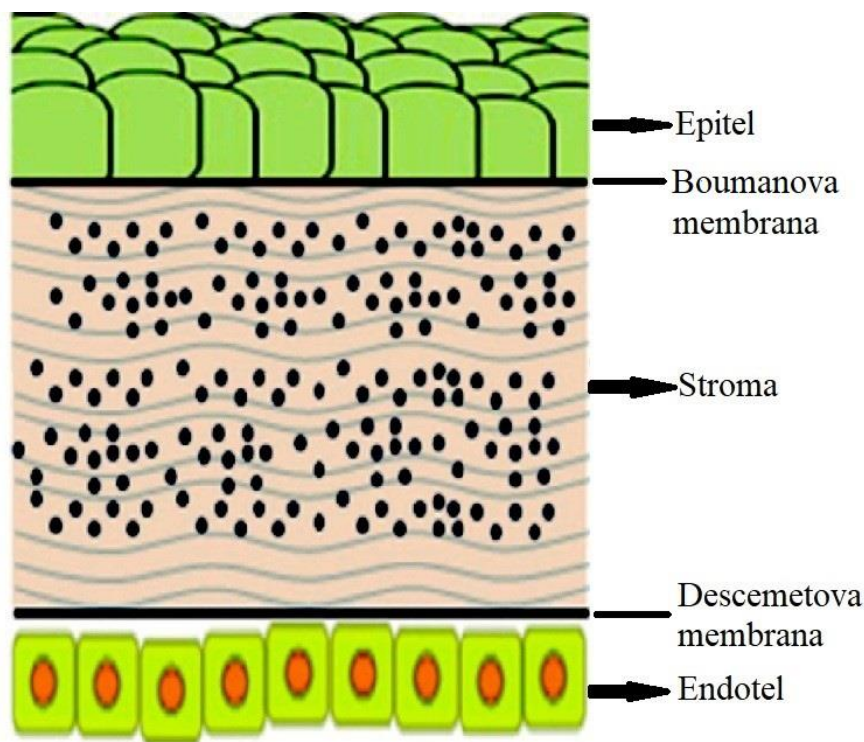


Slika 1.1. Šematski prikaz ljudskog oka (prilagođeno iz [2])

Rožnjača štiti osetljive unutrašnje strukture oka od spoljašnjih štetnih uticaja. Rožnjača je bezbojno, prozirno, avaskularizovano i dobro inervisano tkivo koje se snabdeva hranjivim materijama i kiseonikom iz suzne tečnosti i očne vodice [2]. Sačinjena je od pet do sedam slojeva (slika 1.2): površinskog epitela, prednje granične membrane (engl. *Bowman's Layer*), središnjeg sloja (strome), zadnje granične membrane (*Descemetova* membrana) i unutrašnjeg endotela. Prosečan dijаметar rožnjače iznosi 12 mm, a debljina 520 μm . Suzni film prekriva površinu rožnjače i štiti oko od iritanasa. Epitel je sastavljen od sloja bazalnih ćelija (debljine oko 50 μm) kojeg čine 4–5 slojeva ćelija skvamoznog epitela povezanih međusobno čvrstim vezama (engl. *tight junctions*) kako bi formirale barijeru koja sprečava gubitak tečnosti, ali i penetraciju stranih materija kao što su prašina, bakterije i sl. Epitel je inervisano brojnim tankim nervnim završecima koji čine rožnjaču veoma osetljivom na bol [1, 3]. Površina rožnjače poseduje najveću gustinu nervnih završetaka u poređenju sa drugim organima u ljudskom telu (7000 receptora za bol po mm^2) [2].

Prednja granična membrana (Boumanova membrana) je bezćelijsko vezivno tkivo sačinjeno od snažnih slojevitih proteinskih vlakana, tj. kolagena. Stroma obuhvata najveći deo rožnjače u čijem sastavu je najviše zastupljena voda (78%), a ostatak je dominatno kolagen koji daje čvrstinu, elastičnost i oblik rožnjači. Zadnja granična membrana (*Descemetova* membrana) je tanak, ali čvrst sloj tkiva, sačinjen od kolagenih vlakana, koji služi kao zaštitna barijera od infekcija i povreda. Lako može da se regeneriše nakon povrede. Endotel predstavlja jednoslojni unutrašnji sloj rožnjače,

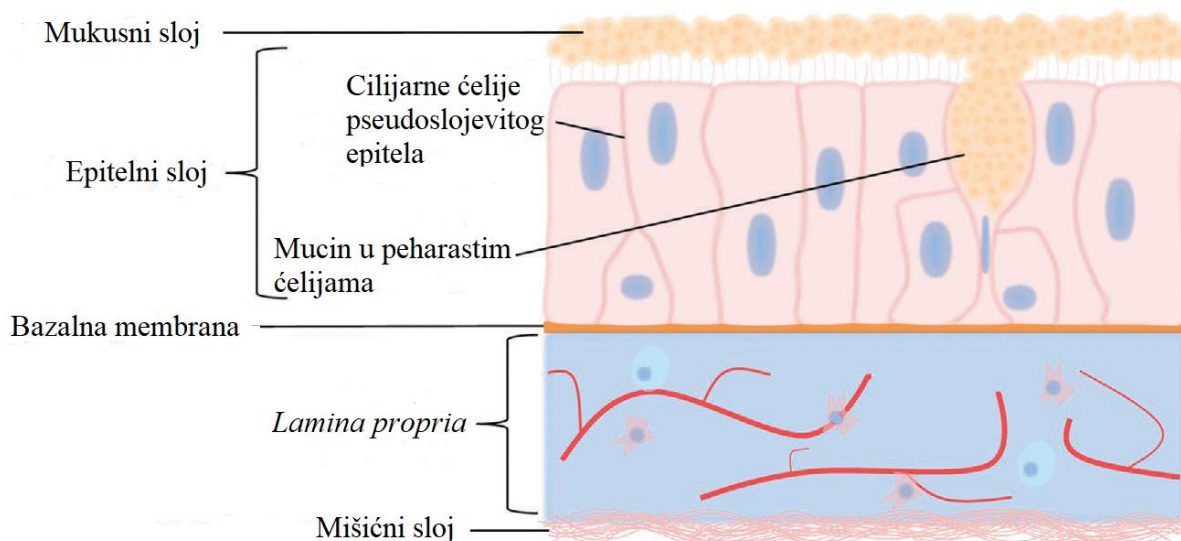
okrenut prema prednjoj očnoj komori. Jedna od najvažnijih funkcija endotela je da održava stromu bistrom i zdravom svojim čvrstim međucelijskim vezama te obezbeđuje hranjive materije i molekule iz očne vodice. Odgovoran je za sintezu Descemetove membrane [1, 3].



Slika 1.2. Šematski prikaz strukture rožnjače (prilagođeno iz [4])

Konjunktiva je sluzokoža koja oblaže unutrašnjost kapaka i prednji deo beonjače do rožnjače. Konjunktiva čvrsto prijanja za ivice rožnjače, a u konjunktivalnoj vrećici (engl. *cul-de-sac*) labavi nabori omogućavaju lako kretanje oka. Dobro je vaskularizovana i u njenom sastavu se nalaze peharaste ćelije koje predstavljaju jednoćelijske žlezde čija je osnovna funkcija lučenje mucina, koji podmazuje oko i sprečava ulazak mikroorganizama (slika 1.3).

Ove okrugle ili ovalne ćelije mogu izlučiti dnevno oko 2,2 ml mukusa koji podmazuje i štiti epitelne ćelije. Pored toga, mukus smanjuje površinsku aktivnost suznog filma, čime omogućava njegovu stabilnost [1]. U konjunktivi se nalaze agregati limfoidnog tkiva koje je obično prisutno u sluzokožama i koje se po svojoj strukturi, lokaciji i ćelijskom sastavu razlikuje od primarnog limfoidnog tkiva (slezina, limfni čvorovi). Ovaj specijalizovani epitel poseduje ćelije sa jedinstvenim apikalnim mikro-naborima koje imaju sposobnost da preuzmu, obrade i isporuče antigene drugim ćelijama (engl. *antigen-presenting cells*) [3].



Slika 1.3. Šematski prikaz građe sluzokože (engl. *mucosal membrane*) (prilagođeno iz [5])

1.1.2 Anatomske i fiziološke barijere oka

Nekoliko prekornealnih faktora utiče na adekvatnu isporuku lokalno aplikovanih lekova u prednji segment oka (slika 1.4). Tu se ubrajaju ukupna doza/aplikovana zapremina, nazolakrimalna drenaža, izmena suza, isparavanje suza, razblaživanje suza, pH vrednost suza, interakcija lek-protein, metabolizam leka i krvno-retinalna barijera [6].



Slika 1.4. Prekornealni faktori koji utiču na okularnu raspoloživost lokalno primenjenih lekova [6]

Primarne anatomske barijere (statičke barijere) za penetraciju lekovitih supstanci u oko su rožnjača i konjunktiva. Epitel i endotel rožnjače zbog prisustva lipida, predstavljaju osnovnu barijeru za permeaciju hidrosolubilnih supstanci, dok stroma ograničava permeaciju liposolubilnih supstanci [1, 7]. Stoga, da bi lek permeirao kroz epitel rožnjače u oko treba da ima odgovarajuću lipofilnost, ali da bude i dovoljno hidrofilan kako bi prošao kroz stromu [8]. Uz rožnjaču, konjunktiva kao prvi sloj prednjeg segmenta oka, predstavlja takođe barijeru za lokalno aplikovane lekove. Zbog prisustva čvrstih veza na apikalnoj površini njenih ćelija, ali i sastava samog tkiva, prisustva enzima esteraze

koji razlaže lekovite supstance, efluksnih transportnih proteina koji prenose lekovite supstance iz ćelijske citoplazme, visokog protoka krvi i prisustva suznog filma, ograničena je permeacija lekovitih supstanci [1].

Beonjača je sledeći deo barijere oka. Njen spoljašnji sloj je delimično prekriven konjunktivom koja se prostire do spoljašnje površine kapaka. Supstance koje permeiraju u krvne sudove konjunktive i beonjače, prelaze u sistemsku cirkulaciju [7].

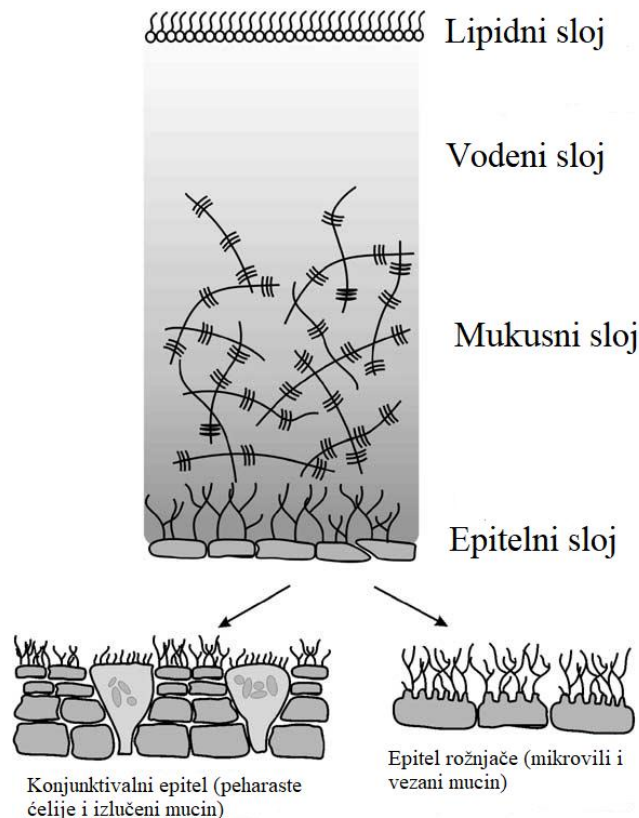
Dinamičke barijere oka uključuju fiziološki i refleksni proces stvaranja suza, refleks treptanja, te nazolakrimalnu drenažu. Proces treptanja omogućava rasprostiranje suzne tečnosti preko površine oka i drenažu suzne tečnosti preko nazolakrimalnog kanala u nos, a zatim niz ždrelo u gastrointestinalni trakt. Cirkulacija limfe i krvi imaju ulogu dinamičkih barijera za apsorpciju lekovitih supstanci. Pored navedenog, ostali fiziološki faktori su proteini prisutni u suznoj tečnosti i metabolizam usled aktivnosti esteraza u prednjem segmentu oka. U zavisnosti od fiziološkog stanja, suzna tečnost sadrži 2% ili više proteina. Veliki broj enzima, prisutnih u suznoj tečnosti, kao što su esteraze, aminopeptidaze i monoaminoksidaze, dovode do inaktivacije velikog broja lekovitih supstanci [1, 7].

Karakteristična anatomska građa i navedeni fiziološki mehanizmi čine prirodnu zaštitu oka od nepovoljnih i štetnih spoljašnjih uticaja, ali ujedno predstavljaju i glavni problem za postizanje i održavanje terapijske koncentracije leka u ciljnom tkivu koja bi trebalo da proizvede odgovarajući farmakološki odgovor [2].

1.1.2.1 Lučenje i drenaža suza

Postoje brojni izazovi u terapiji bolesti oka, a jedan od najvećih je upravo održavanje terapijske koncentracije leka na mestu primene usled stalnog lučenja i drenaže suza [8]. Suzne žlezde luče suznu tečnost koja podmazuje površine konjunktive i rožnjače i formira suzni film. Suzni film omogućava održavanje optičkih svojstava površine rožnjače, snabdevanje kiseonikom i hranjivim materijama avaskularne rožnjače, podmazuje površinu između unutrašnje strane kapaka i površine rožnjače, uklanja strana tela, ćelije, te obezbeđuje antimikrobna svojstva rožnjače [3].

Suzni film (slika 1.5) nastaje kao rezultat aktivnosti lakrimalnog sistema kojeg čine: suzne žlezde (orbitalne i palpebralne) i sekretorni deo (suzna kesica, suzni kanali). Najčešće se opisuje kao složena mešavina koja se sastoji od tri glavna sloja: unutrašnjeg mukusnog sloja ili mucina koji proizvode peharaste ćelije konjunktive, ali i ćelije slojevitog skvamoznog epitela rožnjače i konjunktive; središnjeg vodenog sloja (čini ga 95% vode, elektroliti, glukoza, urea, proteini) kojeg luče suzne žlezde; te površinskog lipidnog sloja koji luče Meibomove žlezde (engl. *Meibomian glands*) smeštene na ivicama očnih kapaka [2, 3]. Lipidni sloj smanjuje isparavanje suzne tečnosti sa površine oka i obezbeđuje stabilnost suznog filma [1]. Sastav lipidnog sloja održava se u fiziološkim granicama pod uticajem androgena. Smanjenje njihove sekrecije, prisutno najčešće kod starijih, jedan je od razloga razvoja sindroma suvog oka [2]. Sastav suza varira u zavisnosti da li je oko otvoreno ili zatvoreno, stimulisano ili ne, u patološkom ili fiziološkom stanju [9]. U normalnim uslovima suzne žlezde luče 1,2 μ l/min suzne tečnosti, ali ova količina može biti i veća pod uticajem različitih mehaničkih ili fizioloških stimulusa [3]. Volumen suzne tečnosti pod fiziološkim uslovima iznosi 7 do 10 μ l sa brzinom izmene od 16% po minuti [8].



Slika 1.5. Šematski prikaz građe suznog filma (prilagođeno iz [10])

Jedan deo izlučenih suza biva izgubljen usled isparavanja (10–25%), a ostatak prolazi kroz nazolakrimalni kanal koji se otvara u donji nosni hodnik. Drenažni sistem počinje u tačkama (gornja i donja) na medijalnim stranama kapaka. Tačke predstavljaju otvore kanalića (prečnika 10 μm do 0,5–1,0 mm). Kanali su obloženi slojevitim skvamoznim epitelom i okruženi mišićem orbikularisom [3, 11].

Suzni film je samo privremeno stabilan. Stabilnost suznog filma može biti narušena u prisustvu površinski aktivnih supstanci koje dovode do rastvaranja površinskog lipidnog sloja. Nakon 10–20 sekundi dolazi do pucanja suznog filma i formiranja suvih tačaka na površini rožnjače. Nastale suve tačke iritiraju nervne završetke u rožnjači i aktiviraju suzni sistem, što pokreće refleks treptanja. Kod osoba koje pate od sindroma suvog oka, suve tačke na rožnjači nastaju i bez prisustva površinski aktivnih supstanci. Stabilnost filma može biti narušena i usled smanjenja lučenja lipida, suza ili mucina. Smanjena stabilnost suznog filma dovodi do povećanja učestalosti treptanja, i jedan je od čestih uzroka pojave sindroma suvog oka [2, 12].

Površinski napon suzne tečnosti zavisi od prisustva mucina, lipokalina i lipida. Normalna vrednost površinskog napona na međupovršini vazduh/suzna tečnost, koji osigurava odgovarajuću stabilnost suznog filma, nalazi se u opsegu 40–46 mN/m i oftalmološki preparati (npr. kapi za oči) čiji površinski napon je manji od 35 mN/m na oku izazivaju osećaj bola i nelagode. Posledično, dolazi do povećanog lučenja suza i učestalijeg treptanja što sve dovodi do bržeg spiranja lekovite supstance sa površine oka i slabije okularne raspoloživosti [2, 13]. Generalno, lipidni sloj suznog filma ključni je faktor odgovoran za površinski napon suzne tečnosti i njegova sposobnost održavanja površinskog napona, značajna je za stabilnost suznog filma [14].

1.1.3 Farmakokinetika lokalno aplikovanih lekova

Topikalna (lokalna) aplikacija, zbog jednostavnosti primene, pogodnosti i neinvazivnosti je najčešći put primene lekova u terapiji oboljenja prednjeg segmenta oka. Kapi za oči čine oko 90% svih oftalmoloških proizvoda dostupnih na tržištu. Neke od prednosti lokalne primene lekova na oko,

pored neinvazivnosti su jednostavnost formulacije i primene, mogućnost samolečenja, čime se poboljšava komplijansa, kao i ekonomska isplativost. U ove svrhe koriste se različiti farmaceutski oblici kao što su kapi za oči, rastvori, kapi za oči suspenzije, masti za oči i gelovi za oči. Međutim, ovaj najpoželjniji put primene ima i izvesna ograničenja. Bioraspoloživost u očnoj vodici je samo 5% za lipofilne molekule, a čak ispod 0,5% za hidrofilne molekule [1, 8]. Mnoge formulacije za lokalnu primenu lekova su efikasne u lečenju oboljenja prednjeg segmenta oka, ali zbog brojnih navedenih barijera na koje lek nailazi i relativno male količine preparata koja se primenjuje, koncentracija lekovite supstance na mestu delovanja je obično minimalna. Bez obzira na navedeno, lokalna primena lekova, ostaje jedan od najracionalnijih puteva primene u lečenju oboljenja prednjeg segmenta oka [1].

Nakon lokalne primene lekova, lekovita supstanca prelazi u intraokularna tkiva kornealnim i nekornealnim putem. U zavisnosti od mesta prolaska, može se razlikovati farmakokinetika lekovite supstance prednjeg i zadnjeg segmenta oka. Nakon primene leka u donju konjunktivalnu vrećicu, lekovita supstanca prvo mora proći kroz epitel rožnjače. Molekule lekovitih supstanci prolaze ćelijske membrane u najvećoj meri mehanizmom pasivne difuzije, olakšane difuzije i aktivnim transportom posredstvom nosača [15].

Rožnjača se ponaša kao tipična ćelijska membrana i rastvorene supstance prolaze ovu strukturu transcelularnim i paracelularnim putem [4, 15]. Pri fiziološkim pH vrednostima, površina rožnjače je negativno naelektrisana zbog negativno naelektrisanih karboksilnih grupa proteina koji čine čvrste veze. Stoga, negativno naelektrisani molekuli usled odbojnih sila imaju poteškoće u prolasku kroz međućelijske pore epitela rožnjače. Sa druge strane, pozitivno naelektrisane molekule imaju bolju isporuku u rožnjaču. Međutim, jonska interakcija između negativno naelektrisanih proteina čvrstih veza i pozitivno naelektrisanih molekula, s druge strane, takođe mogu predstavljati prepreku za permeaciju takvih molekula. Dakle, rožnjača omogućava pasivni transport molekula kroz svoje ćelije i taj transport će zavisiti od prirode lekovite supstance i ekscipijenas, tj. nalazi se pod uticajem različitih faktora, kao što su lipofilnost, molekulska masa, naelektrisanje i stepen jonizacije lekovite supstance [1].

Epitel konjunktive zbog slične građe ponaša se slično epitelu rožnjače [3]. Međutim, u poređenju sa isporukom lekova kroz rožnjaču, isporuka kroz konjunktivu je znatno slabije istražena što nije očekivano, s obzirom na to da je konjunktiva uvek zahvaćena kada se radi o lokalnoj aplikaciji lekova u lečenju oboljenja prednjeg segmenta oka [1]. Nakon prolaska kroz konjunktivu, lekovite supstance dospevaju u subkonjunktivalni venski pleksus preko kojeg prelaze u sistemsku cirkulaciju. Pored toga, nakon lokalne primene, dolazi i do dreniranja preko nazolakrimalnog kanala u nos gde se dalje javlja sistemski apsorpcija preko sluzokože nosa. Iz ovih razloga, promenom lokalnih uslova, kao što je povećanje viskoziteta suznog filma, moguće je produžiti vreme zadržavanja leka na mestu primene, u cilju poboljšanja okularne raspoloživosti [2, 3].

Volumen prekornealnog suznog filma je oko 7 μ l uz mogućnost akomodacije konjunktivalne vrećice čiji kapacitet iznosi približno 15–30 μ l [3]. Zapremina jedne kapi za oči koje se primenjuju lokalno putem komercijalnih kapaljki iznosi od 25 μ l do 70 μ l [7], ali višak tečnosti biva uklonjen drenažom kroz nazolakrimalni kanal i usled treptanja. Stoga, aplikacija više od jedne kapi neće dovesti do poboljšanja okularne raspoloživosti, ali može prouzrokovati sistemske toksične efekte usled apsorpcije. Kapi za oči manjih zapremina bile bi korisne za poboljšanje okularne raspoloživosti i odnosa korist-rizik kod lekovitih supstanci za koje je poznato da pokazuju sistemsku toksičnost [3, 15]. Takođe, suzna sekrecija može biti povećana usled stimulacije senzornih nerava rožnjače koji su veoma osetljivi na nespecifične stimuluse, kao što su pH, osmolalnost, priroda lekovite supstance ili faktori formulacije, što dovodi do ubrzane eliminacije leka iz prekornealnog prostora [15].

Većina lekovitih supstanci koje se primenjuju lokalno na oku su u obliku soli kiselina i baza. Njihove molekule u suznom filmu nalaze se pod uticajem pH vrednosti suznog filma u zavisnosti od njihove koncentracije i svojstava. Stoga, obim njihove okularne raspoloživosti zavisice od njihove pKa vrednosti pri pH vrednosti prekornealnog suznog filma. Pored pKa vrednosti lekovite supstance, njene molekulske mase, prisustvo konzervanasa, površinski aktivnih supstanci, sastav vehikuluma i osmolalnost formulacije su takođe faktori koji određuju farmakokinetiku lekova u oku. Određeni

konzervansi koji ulaze u sastav formulacija za lokalnu primenu, kao što je benzalkonijum-hlorid, mogu da povećaju okularnu raspoloživost lekova tako što dovode do promena u ćelijskoj membrani [15].

Na osnovu svega navedenog, dizajniranje novih sistema za isporuku lekova u ciljna tkiva koji mogu dostaviti i održavati odgovarajuću terapijsku koncentraciju bez ili sa minimalnim neželjenim efektima glavni je fokus u trenutnim istraživanjima na polju oftalmoloških preparata [1, 16].

1.2 METODE ZA PREVAZILAŽENJE PROBLEMA NISKE OKULARNE RASPOLOŽIVOSTI

Na osnovu prethodno navedenih anatomsko-fizioloških karakteristika oka i oftalmološkog puta primene lekova, „idealni“ preparat za oftalmološku primenu trebalo bi da poseduje sledeće karakteristike:

- da se jednostavno primenjuje od strane pacijenta, bez stručne pomoći i da učestalost primene bude svedena na minimum;
- da ima dobru podnošljivost, bez izazivanja pojave neželjenih efekata, kao i minimalan uticaj na fiziologiju oka (npr. zamagljen vid);
- da omogući produženi kontakt lekovite supstance sa tkivom rožnjače, uz minimalan prekornealni gubitak, kao i lak prolazak kroz rožnjaču [6].

Međutim, najveći izazov u terapiji oboljenja oka je održavanje terapijske koncentracije lekovite supstance na mestu primene, što predstavlja osnovni uzrok niske okularne raspoloživosti [2]. Iz tog razloga, često je potrebno učestalo doziranje visokih koncentracija lekovitih supstanci kako bi se postigao adekvatan terapijski efekat, što dalje može dovesti do neželjenih efekata i oštećenja ćelija na površini oka, a posledično i slabije komplijanse [1]. Različite formulacije i terapijske strategije se primenjuju u cilju povećanja koncentracije lekovite supstance na mestu delovanja i poboljšanja okularne raspoloživosti u ciljnom tkivu prednjeg i zadnjeg segmenta oka [4].

Korišćenje mukoadhezivnih polimera koji povećavaju viskozitet suznog filma i pojačivača penetracije predstavljaju dva pristupa kojima se postižu izraženiji terapijski efekti uz smanjenje neželjenih sistemskih efekata, primenom nižih koncentracija aktivnih supstanci. Oftalmološki preparati bazirani na mukoadhezivnim supstancama i pojačivačima penetracije su jednostavni za proizvodnju i pokazuju odličnu toleranciju kada se primenjuju na rožnjaču. Prvi pristup dovodi do značajnog produžavanja vremena kontakta preparata sa rožnjačom, dok drugi pristup dovodi do povećanja brzine i količine transportovane lekovite supstance [17].

1.2.1 Primena polimera kao sredstava za povećanje viskoziteta

Prvi formulacioni pristupi za poboljšanje okularne raspoloživosti odnose se na uvođenje polimera u sastav tečnih oftalmoloških preparata. Hidrofilni polimeri, pre svega polisaharidi i njihovi derivati ulaze u sastav određenog broja tečnih i hidrogel oftalmoloških preparata pri čemu povećavaju raspoloživost primenjenih lekova i unapređuju terapiju različitih oboljenja oka, delujući različitim mehanizmima. Sposobnost polimera da poveća viskozitet suznog filma, ali i ispoljavanje bioadhezivnih svojstava, doprinosi značajnom smanjenju drenaže, produženom zadržavanju preparata na mestu primene, te boljoj terapijskoj efikasnosti primenjenog upotrebljenog leka [18]. Pored viskoziteta, za produžavanje vremena zadržavanja na površini oka, značajni su i drugi faktori, kao što su površinska aktivnost, adhezija za površinu oka, kao i interakcija sa mucinom [2].

U cilju poboljšanja okularne raspoloživosti korišćeni su različiti hidrofilni polimeri kao što su polivinilalkohol, poloksameri, derivati celuloze, hijaluronska kiselina, karbomeri i ksantan guma. Svi navedeni polimeri u većoj ili manjoj meri doprinose povećanju viskoziteta tečnih oftalmoloških preparata, ali ne postoji usaglašenost o optimalnoj vrednosti ovog parametra. Viskoзитet većine komercijalnih kapi za oči iznosi od 15 do 25 mPa·s. Viskoзитet oftalmoloških preparata u opsegu 15–

150 mPa·s omogućava duže zadržavanje preparata u konjunktivalnoj vrećici i bolje odupiranje drenažnom sistemu [1, 7]. Viskozitet suzne tečnosti nalazi se obično u opsegu 1,3–5,9 mPa·s [2].

Generalno, pacijenti slabo podnose isuviše viskozne tečne preparate zbog sila smicanja koje se javljaju pri pokretanju oka i treptanju. Stoga, pseudoplastična svojstva, odnosno smanjenje viskoziteta (engl. *shear-thinning*) usled povećanja brzine smicanja prilikom treptanja je poželjno kod formulacija namenjenih za lokalnu oftalmološku primenu. Pored viskoziteta, mukoadhezivnost i prijatan osećaj nakon primene imaju značajne uloge za okularnu raspoloživost, komplijasnú i konačan terapijski efekat [19].

Većina biopolimera koji ulaze u sastav tečnih oftalmoloških preparata uključuju prirodne, sintetske i polusintetske visokomolekulske supstance, koje su sposobne da formiraju jake nekovalentne veze sa mucinom koji oblaže biološke membrane, tj. poseduju mukoadhezivna svojstva [18]. Mukoadhezivni polimeri se koriste u formulaciji viskoznih kapi za oči, gelova, inserata i mikročestičnih sistema [20].

Mukoadhezivnost je svojstvo nekih prirodnih i sintetskih makromolekula koje omogućava njihovo zadržavanje na mestu primene čime se može postići produženo delovanje. Pojedini primeri mukoadhezivnih polimera za oftalmološku primenu su derivati celuloze (metilceluloza, karboksimetilceluloza, hidroksipropilceluloza i hidroksietilceluloza), polivinilalkohol, poliakrilna kiselina, hitozan i hijaluronska kiselina. Biodegradabilnost, biokompatibilnost i netoksičnost prirodnih biopolimera, naročito glukozaminoglikana, čini ove supstance odličnim kandidatima za razvoj savremenih oftalmoloških preparata [15, 18]. Osobine polimera koje utiču na ispoljavanje mukoadhezivnosti su hidratacija ili stepen bubrenja, molekulska masa, konformacija molekule ili fleksibilnost i pokretljivost polimernih lanaca, funkcionalne grupe i koncentracija [10]. Molekulska masa je generalno jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na funkcionalne karakteristike polimera, kao što su polisaharidi [21].

Uočeno je da naelektrisani polimeri, bilo anjonski ili katjonski, poseduju veći mukoadhezivni kapacitet od nejonskih polimera kao što su celulozni etri ili polivinilalkohol. Katjonski mukoadhezivni polimeri (npr. hitozan) stupaju u elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim mucinom, dok se interakcija između negativno naelektrisanih polimera (npr. hijaluronska kiselina, natrijum-alginat, ksantan guma, pektin) i epitela rožnjače zasniva pre svega na intenzivnom formiranju vodoničnih veza [10]. Poznato je da hidrofilni bioadhezivni polimeri poseduju veliki broj funkcionalnih grupa kao što sulfatne, hidroksilne, karboksilne i amidne koje formiraju brojne nekovalentne veze sa slojem mucina u prekornealnom području i na konjunktivi gde god je mucin prisutan [1]. U oftalmološkim preparatima, bioadhezivni nehidratirani polimeri koriste se u koncentracijama u kojima ispoljavaju optimalan viskozitet. U nabubrelom, odnosno hidratisanom stanju, razdaljina između lanaca polimera dovodi do fleksibilnosti polimera što omogućava ujednačeno širenje na rožnjači i konjunktivi. Sila interakcije polimer-mucin se javlja kada mukoadhezivni polimer interreaguje sa epitelom rožnjače. Korišćenjem *in vitro* viskozimetrijskih podataka, pomenuta interakcija se može definisati kao polimer-mucin sila interakcije u predelu rožnjače [15].

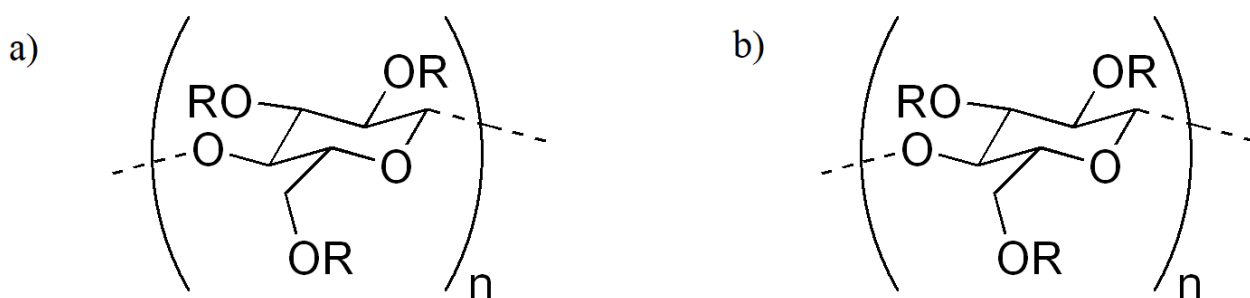
Ispiranje mukoadhezivnih polimera zavisi više od brzine izmene mukusnog sloja (približno 15 do 20 h) nego izmene suzne tečnosti [10]. Pored toga što se intenzivno proučavaju u cilju produžavanja vremena zadržavanja leka u prekornealnoj površini, pokazalo se da mukoadhezivni polimeri štite površinu oka od iritirajućeg efekta nekih lekova [15]. Pojavljuju se i kao aktivne supstance u preparatima tipa veštačkih suza koje se koriste u tretmanu suvog oka radi svog lubrikantnog i vlažećeg efekta na oku. Polimeri koji se koriste za povećanje viskoziteta imaju i određene nedostatke kao što su zamagljenje vida, a može doći i do njihovog zadržavanja na trepavicama i osećaja lepljenja [22]. Ovi neželjeni efekti se uglavnom dešavaju pri višim vrednostima viskoziteta, zbog čega je potrebno koristiti odgovarajuće koncentracije polimera. Previsok viskozitet tečnih oftalmoloških preparata takođe može biti nepoželjan i sa aspekta izrade preparata jer može otežati proces filtracije naročito u toku sterilizacije gde se koriste filteri izrazito male veličine pora (0,22 μm) [23].

Izbor bioadhezivnog polimera za formulaciju oftalmoloških preparata zavisi od brojnih faktora, ali pre svega viskoziteta i vlažećih svojstava polimera. Viskozitet polimera zavisi od molekulske mase, koncentracije, temperature i sile smicanja. Polimeri koji pokazuju nenjutnovsko ponašanje utiču na pseudoplastično ponašanje formulacije čiji viskozitet opada sa porastom brzine smicanja što kao rezultat ima znatno manji otpor prilikom treptanja i bolje prihvatanje od strane pacijenata u poređenju sa formulacijama koje sadrže polimere koje ispoljavaju njutnovsko ponašanje i kod kojih nema stvarnog poboljšanja okularne raspoloživosti [1]. Sve prethodno navedeno ukazuje na značaj razmatranja svih fizičko-hemijskih i funkcionalnih karakteristika polimera u toku rane faze formulacije oftalmoloških preparata, kako bi se postigao željeni efekat [24, 25].

1.2.1.1 Derivati celuloze

Polisaharidi, kao što su celuloza, hijaluronska kiselina, hitozan, alginat i njihovi derivati uspešno se koriste za unapređenje terapije različitih oboljenja oka. Hemijskim modifikacijama polisaharida moguće je unaprediti njihove reološke, mukoadhezivne i druge karakteristike i na taj način formulisati lek optimalne biokompatibilnosti, biodegradabilnosti, poboljšane bioraspoloživosti uz postizanje odgovarajućeg farmakološkog efekta. Polisaharidi ulaze u sastav velikog broja komercijalnih preparata za oči kao inertni ugušćivači, dok se neki od predstavnika koriste prilikom hirurških intervencija (npr. hijaluronska kiselina) ili kao intravitrealni inserti (npr. mikrokristalna celuloza) [19].

Derivati celuloze su predstavljali prvu grupu polimera koja i danas najčešće ulazi u sastav preparata za oči kao što su kapi za oči i rastvori za održavanje kontaktnih sočiva, kao sredstva za povećanje viskoziteta [10, 19]. Kao sredstva za povećanje viskoziteta imaju vrlo dobre reološke karakteristike (viskozitet rastvora se kreće u rasponu od 400–15000 mPa·s), dobro se podnose na oku, kompatibilna su sa velikim brojem lekovitih supstanci i stabilna su pri autoklaviranju (120 °C) [26]. Derivati celuloze koji najčešće ulaze u sastav oftalmoloških preparata su: metilceluloza, hidroksietilceluloza (HEC), hidroksipropilceluloza, hipromeloza/hidroksipropilmetilceluloza (HPMC) i karboksimetilceluloza [19]. U cilju povećanja viskoziteta, HEC i HPMC se u oftalmološkim preparatima uobičajeno koriste u koncentraciji 0,2–2,5% [7, 27].



Slika 1.6. Strukturne formule: HPMC (a) i HEC (b)

Hipromeloza (HPMC) najčešće ulazi u sastav preparata tipa veštačkih suza koje se koriste u tretmanu sindroma suvog oka. Posедуje veliki broj –OH grupa (slika 1.6a) koje formiraju vodonične veze i hidrofobne metil grupe. Njihova amfifilna priroda omogućava potrebnu hidrofobnost kako bi se vezali za hidrofobni epitel i matriksni glikokaliks, istovremeno dajući dovoljan broj hidroksilnih grupa koje vezuju molekule vode, što ih čini zamenom za mucin [15]. Pored uticaja celuloznih etara na viskozitet rastvora, ova jedinjenja poseduju izražena lubrikantna svojstva i povećavaju vreme

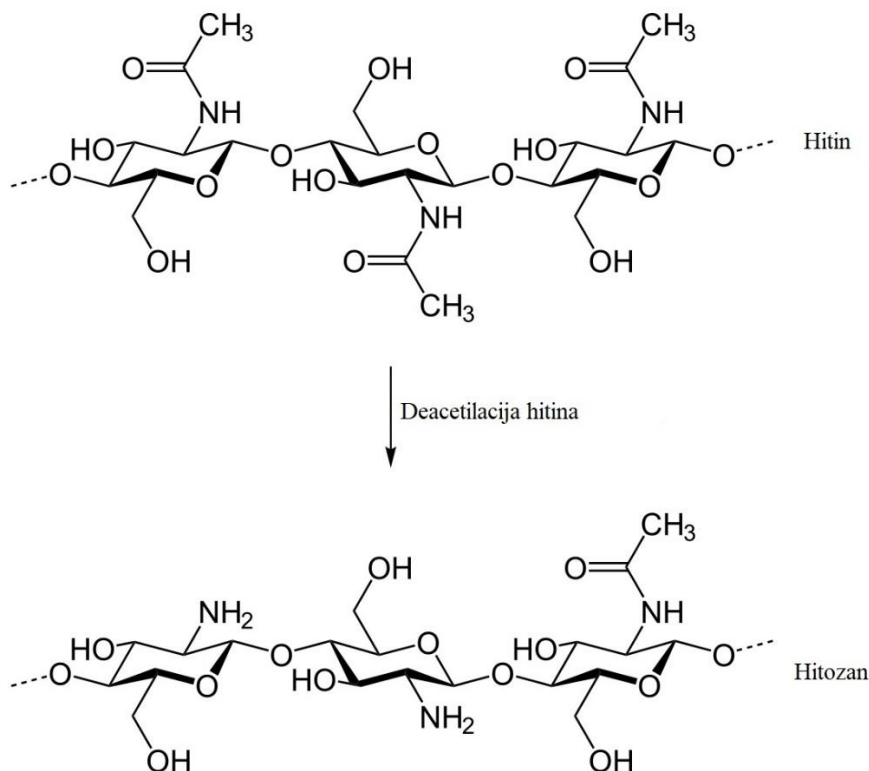
kontakta preparata sa rožnjačom zahvaljujući sposobnosti obrazovanja filma [15]. Određeni celulozni derivati (npr. HPMC i hidroksipropilceluloza) poseduju izraženu površinsku aktivnost, stupaju u interakciju sa komponentama suznog filma, menjajući fizičko-hemijska svojstva utiču na poboljšanje stabilnosti suznog filma. Međutim, sredstva koja povećavaju viskozitet i ujedno imaju izraženu površinsku aktivnost, dovode do promene u brzini treptanja, što zauzvrat dovodi do brže eliminacije primenjenog preparata. Mogu izazvati iritaciju i obilnu lakrimaciju dovodeći do bržeg ispiranja leka i posledično lošije okularne raspoloživosti. Generalno, polimeri sa slabije izraženom površinskom aktivnošću, kao što je HEC (slika 1.6b), imaju znatno bolju podnošljivost.

Iako se u literaturi navodi da derivati celuloze (HPMC, HEC, metilceluloza) poseduju mukoadezivne karakteristike [15], mukoadezivni kapacitet nejonskih derivata je slabo izražen [1, 10]. Pored toga, primena derivata celuloze je ograničena kratkotrajnim ispoljavanjem efekata u poređenju sa drugim polisahardinim polimerima [15].

1.2.1.2 Hitozan

Hitozan je, bezbedni, biokompatibilni, biodegradabilni i ekološki prihvatljiv binarni heteropolisaharid koji se sastoji iz 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranoze i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoze povezanih β (1-4) glikozidnim vezama (slika 1.7). Dobija se procesom deacetilacije iz hitina, jednog od najrasprostranjenijih prirodnih polimera, pri temperaturi 100 – 160 °C u prisustvu 40–50% alkalnog rastvora pri čemu se postiže stepen deacetilacije do 95% [21, 28]. Poželjno je da stepen deacetilacije bude iznad 80–85% kako bi se dobili rastvorljivi proizvodi koji pokazuju bolje mukoadezivne karakteristike i dobru biokompatibilnost [27, 29].

Termin hitozan odnosi se na deacetilovane oblike hitina, različitog stepena deacetilacije i depolimerizacije i zbog toga nije lako definisati tačan hemijski sastav. Komercijalno su dostupni različiti oblici hitozana koji se međusobno razlikuju po stepenu deacetilacije, molekulskoj masi (10 000–1 000 000) i viskozitetu rastvora [27].



Slika 1.7. Proces dobijanja hitozana deacetilacijom hitina [30]

U monografiji hitozan-hidrohlorida (Ph. Eur. 10.0) navodi se da je to linearni binarni heteropolisaharid, koji se dobija deacetilacijom iz hitina (stepen deacetilacije 70–95%). Hitin se ekstrahuje iz omotača škampi i rakova. Hitozan-hidrohlord je beli ili skoro beli fini prašak, umereno rastvorljiv u vodi, a praktično nerastvorljiv u etanolu [27, 30].

Rastvorljivost i druge fizičke karakteristike hitozana zavise od molekulske mase i stepena deacetilacije. Zbog prisustva velikog broja slobodnih amino grupa, hitozan je slaba baza čija pKa vrednost iznosi 6,3. Usled neprotonovanja, hitozan se ne rastvara u vodi u neutralnoj i alkalnoj sredini. Pri nižim pH vrednostima ($\text{pH} < 6,0$), amino grupe se protonuju i postaju pozitivno naelektrisane što hitozan čini u vodi rastvorljivim katjonskim polielektrolitom. Kao najčešće korišćen rastvarač za hitozan, koristi se rastvor sirćetne kiseline (1%, V/V) [30].

Pored rastvorljivosti, viskozitet rastvora hitozana je još jedna značajna karakteristika koju je potrebno razmotriti prilikom njegove farmaceutske primene. Viskozitet rastvora hitozana pored molekulske mase, zavisi i od upotrebljene koncentracije, pH vrednosti, temperature i jonske jačine [28]. Rastvori hitozana poseduju pseudoplastične i viskoelastične karakteristike, što je poželjno kod tečnih oftalmoloških preparata, s obzirom da suzni film ima pseudoplastični karakter. Reološka svojstva hitozana takođe omogućavaju zadržavanje preparata na mestu primene jer se formulacija lako rasprostire treptanjem [31, 32]. Za sterilizaciju preparata izrađenih sa hitozanom, mogu se primenjivati različite metode kao što su jonizujuće zračenje, sterilizacija parom ili hemijske metode, što je vrlo značajno sa aspekta formulacije oftalmoloških preparata [33].

Prisustvo slobodnih amino grupa u strukturi hitozana ima značajnu ulogu u elektrostatičkim interakcijama sa suprotno naelektrisanim jonima, tj. unakrsnom povezivanju/umrežavanju sa polivalentnim anjonima, što čini hitozan veoma pogodnim polimerom za primenu u prehrambenoj, tekstilnoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Potencijal primene hitozana u medicinske svrhe ogleda se u njegovoj netoksičnosti u živim ćelijama, antimikrobnoj aktivnosti protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, poboljšanju epitelne permeabilnosti, mukoadhezivnosti i biodegradabilnosti [21].

Biodegradabilnost hitozana se uglavnom pripisuje njegovoj osetljivosti na hidrolizu proteolitičkim enzimom lizozimom, koji se nalazi u svim humanim tkivima, a prisutan je i u suznoj tečnosti. Pored toga, lipaza, enzim prisutan u salivi, želudačanom i pankreasnom soku ima sposobnost razlaganja hitozana. Proizvodi enzimske degradacije su takođe netoksični [21]. Okularna biokompatibilnost i toksičnost su kritični aspekti koji se moraju razmotriti pri razvoju sistema za kontrolisanu isporuku leka u oko, naročito kada je poznato da različita stanja i oboljenja oka zahtevaju hroničnu terapiju. Sprovedene su brojne studije u kojima su praćene funkcije oka, kao i moguća neugodnost ili iritacija, nakon lokalne primene preparata sa hitozanom kao nosačem aktivne supstance. Potvrđeno je da biokompatibilnost i netoksičnost čine hitozan pogodnim polimerom za formulaciju oftalmoloških preparata namenjenih za lokalnu primenu [32, 34].

Hitozan se u biološkoj sredini efikasno i neselektivno vezuje za mukozne površine [30]. Bioadhezivnost hitozana potvrđena je u *ex vivo* studiji, u kojoj je hitozan obeležen radioizotopom, aplikovan u obliku rastvora na sveže izolovanu govedu rožnjaču, a aktivnost radioizotopa merena je scintilacionim brojačem. Smatra se da su katjonska priroda i elektrostatičke interakcije odgovorne za pojavu primarnih sila u okviru mukoadhezije do koje dolazi usled reakcije pozitivno naelektrisanih amino grupa hitozana i negativno naelektrisanih ostataka sijalinske kiseline prisutnih u mucinu, osnovnom glikoproteinu mukusa. Dodatno, stvaranje vodoničnih veza i hidrofobne interakcije takođe imaju ulogu u vezivanju molekula hitozana za mukozne površine. Takođe, pH rastvora hitozana, kao i prisustvo drugih supstanci doprinosi ovoj interakciji. Svojstvo mukoadhezivnosti postaje izraženije u neutralnoj i blago alkalnoj sredini kakva vlada u suznom filmu [29, 32].

Zbog svih navedenih pozitivnih karakteristika, hitozan je našao široku primenu u kozmetičkoj, prehrambenoj i tekstilnoj industriji, a intenzivno se istražuje u brojnim preparatima za farmaceutsku primenu i to kao sredstvo sa oblaganje, dezintegrator u tabletama i kapsulama, bioadhezivno sredstvo, pomoćna supstanca za formiranje filmova, sredstvo za vezivanje kod tableta i kapsula, te sredstvo za povećanje viskoziteta [21, 27].

Postoje brojni podaci da je katjonski polimer hitozan zapravo polimer izbora za oftalmološku primenu jer pored mukoadhezivnog karaktera deluje i kao pojačivač propustljivosti ćelijskih membrana tako što utiče i na međućelijske i na intraćelijske puteve epitelnih ćelija na reverzibilan način, bez izazivanja oštećenja ćelijske membrane i uticaja na vijabilnost [1, 32].

Hitozan poboljšava penetraciju aktivnih supstanci paraćelijskim putem otvaranjem uskih spojeva između epitelnih ćelija. U *in vitro* studijama, pokazano je da hitozan dovodi do snižavanja transepitelnog električnog otpora (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER) što ukazuje na slabljenje ili otvaranje čvrstih međućelijskih veza [4, 35]. Pored toga, postoje podaci koji ukazuju i na ulogu hitozana u povećanju ćelijske propustljivosti transcelularnim putevima usled moguće interakcije sa fosfolipidima unutar ćelijske membrane [36-38]. Sve navedeno čini ga jednim od najperspektivnijih kandidata jer pokazuje vrlo malu, ili zanemarljivu toksičnost u koncentracijama koje su neophodne da ispolji efekat povećanja penetracije [35].

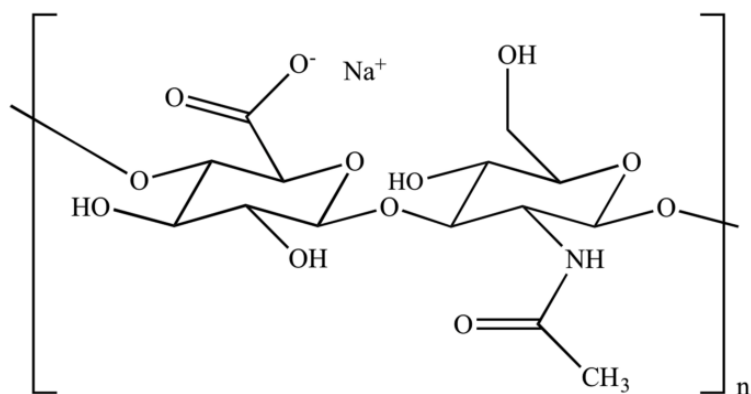
Osim navedenog, sprovedena su ispitivanja rastvora hitozana kao zamene za suze u tretmanu sindroma suvog oka. Upotreba hitozana u ove svrhe bazira se na mogućnosti rasprostiranja po celoj rožnjači i odličnoj toleranciji nakon primene [39]. Antimikrobna aktivnost hitozana predstavlja dodatnu prednost jer se sekundarne infekcije često javljaju kao prateća pojava sindroma suvog oka [39]. Dodatno, intenzivno se istražuje primena hitozana i u sistemima za kontrolisanu isporuku leka u oko, jer značajne biološke karakteristike kao što su antimikrobna aktivnost i mogućnost bržeg zarastanja rana takođe mogu imati ulogu u terapiji različitih oboljenja oka [40-42].

1.2.1.3 Natrijum-hijaluronat

Hijaluronska kiselina je prirodni polisaharid koji se nalazi u koži, vezivnom tkivu, pupčanoj vrpci, staklastom telu oka i sinovijalnoj tečnosti. Dobija se fermentacijom korišćenjem odabranih bakterijskih sojeva *Streptococcus zooepidemicus*. Hemijski, to je visoko molekulski polianjonski linearni mukopolisaharid sačinjen od naizmenično poređanih jedinica N-acetilglukozamina i D-glukuronske kiseline (slika 1.8) [19, 29]. Natrijum-hijaluronat je predominantni oblik hijaluronske kiseline pri fiziološkim pH vrednostima. To je beo ili skoro beo, vrlo higroskopan prašak ili fibrozni agregati. Ulazi u sastav brojnih farmaceutskih preparata namenjenih za primenu na koži i slukoži, parenteralnu i oftalmološku primenu. Koristi se kao humektans, lubrikans i sredstvo za modifikovanje mehanizma i/ili brzine oslobađanja lekovite supstance iz različitih farmaceutskih oblika [27, 43].

Glavne prednosti hijaluronske kiseline su odlična biokompatibilnost i mukoadhezivnost, kao i pseudoplastično i viskoelastično ponašanje. Produženo zadržavanje hijaluronske kiseline na površini oka je jedna od najznačajnijih karakteristika prilikom njene upotrebe u veštačkim suzama u okviru terapije sindroma suvog oka, dok pseudoplastično ponašanje obezbeđuje dobro rasprostiranje polimera po površini oka tokom procesa treptanja. Hijaluronska kiselina se takođe može unakrsno vezivati, pa se kao ekcipient koristi u sastavu filmova, inserata ili nanočestica sa mogućnošću postizanja produženog zadržavanja, oslobađanja i delovanja inkorporiranih lekovitih supstanci [19].

U poređenju sa hitozanom, hijaluronska kiselina ima manje izražena mukoadhezivna svojstva, tj. da bi se postigao sličan nivo mukoadhezivnosti bilo bi potrebno koristiti hijaluronsku kiselinu u koncentraciji koja daje izrazito viskozne rastvove, a koji dovode do osećaja neprijatnosti kod pacijenata i nepoželjnog refleksnog treptanja. S obzirom da je hijaluronska kiselina anjonski polisaharid, smatra se da primarna sila bioadhezije potiče od formiranja vodoničnih veza i interpolimerne difuzije [19].



Slika 1.8. Strukturna formula natrijum-hijaluronata

Molekuli natrijum-hijaluronata imaju slične fizičke karakteristike i sastav kao glikoproteini suza i zahvaljujući tome lako oblažu epitel rožnjače. Polimeri adsorbovani na međupovršinu mucin/vodeni sloj protežu se u susednu vodenu fazu čime se stabilizuje deblji sloj vode [10]. Rastvor natrijum-hijaluronata (1%) obrazuje viskoelastični gel koji ima optička svojstva slična staklastom telu. Koristi se tokom intraokularnih operacija prednjeg i zadnjeg segmenta oka kako bi se održao oblik očne jabučice i zaštitila rožnjača tokom hirurškog zahvata [29]. Brojne studije su pokazale značajno poboljšanje okularne raspoloživosti i terapijskog efekta formulacija koje sadrže natrijum-hijaluronat u odnosu na komercijalno dostupne preparate sa istom lekovitom supstancom zahvaljujući sposobnosti natrijum-hijaluronata da produži oslobađanje lekovite supstance usled produženog zadržavanja preparata na površini oka [44, 45].

Produženo zadržavanje na mestu primene je upravo jedan od ključnih faktora upotrebe natrijum-hijaluronata u veštačkim suzama tokom terapije keratokonjunktivitisa, koje su se pokazale veoma efikasne u ublažavanju uobičajenih simptoma poput zamućenog vida, bola i fotofobije [46]. Natrijum-hijaluronat se često predlaže kao vehikulum u veštačkim suzama jer pokazuje zaštitni efekat kod oštećenja izazvanih benzalkonijum-hloridom, najčešće korišćenim konzervansom u kapima za oči [46]. Pored toga, poseduje odgovarajuća viskoelastična i biofizička svojstva slična mucinu pružajući dugotrajnu hidrataciju i dobru lubrikaciju očne površine [10]. Nekonzervisane kapi za oči koje sadrže 0,1 % natrijum-hijaluronata su se pokazale korisne u tretmanu suvog oka zbog svog nenjutnovskog i pseudoplastičnog ponašanja i već u toku od sat vremena nakog primene smanjuju simptome kao što su osećaj peckanja i žuljanja [47]. Pseudoplastični rastvori natrijum-hijaluronata imaju nizak viskozitet pri velikim brzinama smicanja, tako da se lako i brzo rasprostiru po površini oka nakon treptanja, za razliku od rastvora koji pokazuju njutnovsko ponašanje (viskozitet ne zavisi od brzine smicanja) i značajno viši viskozitet prilikom treptanja, zbog čega se teže distribuiraju po površini oka, a mogu da dovedu i do ometanja vida [15, 29]. Kod pacijenata koji pate od sindroma suvog oka, najčešće je prisutna nestabilnost suznog filma koja se može poboljšati povećanjem njegovog viskoziteta. Viskoelastični polimeri kao što je natrijum-hijaluronat povećavaju viskozitet, ali poseduju i elastična svojstva, tako da poboljšavaju zaštitu oka značajnije od klasičnih pseudoplastičnih polimera koji se dodaju radi povećanja viskoziteta [2]. Takođe, navodi se da natrijum-hijaluronat poboljšava zarastanje konjunktivalnog epitela, oštećenog kod sindroma suvog oka, jer pospešuje migraciju i aktivnost peharastih ćelija. Pretpostavlja se da se hijaluronat vezuje za CD44 receptore koji su zastupljeni na rožnjači i konjunktivi indukujući proliferaciju ćelija [48].

Zbog svih pozitivnih karakteristika, oftalmološki preparati sa hijaluronskom kiselinom ispoljavaju sledeće korisne efekte na epitelu rožnjače: (a) štite od dehidracije, (b) skraćuju vreme potrebno za lečenje, (c) ublažavaju inflamatorni odgovor prouzrokovan dehidracijom, (d) vlaže površinu oka. Zbog svojih kliničkih efekata, hijaluronat nalazi široku primenu u oftalmološkim preparatima ne samo kao ekscipijens u cilju povećanja okularne raspoloživosti lekovitih supstanci, već i kao aktivna supstanca u preparatima za ublažavanje i otklanjanje simptoma prouzrokovanih sindromom suvog oka [19, 49].

1.2.1.4 Hidroksipropil guar guma

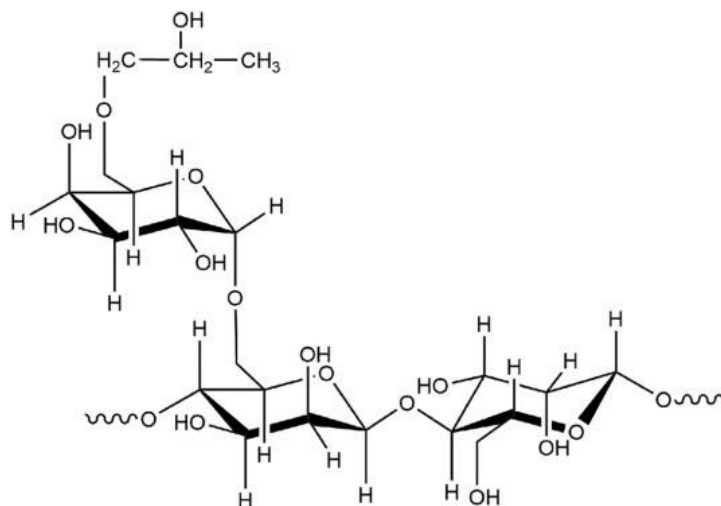
Guar guma je visokomolekulski, nejonski, hidrokoloidni polisaharid dobijen iz endosperma semena indijske biljke *Cyamopsis tetragonolobus* (familija *Leguminosae*). Sastoji se iz linearnih lanaca (1,4)- β -D-manopiranozil i α -D-galaktopiranozil jedinica povezanih (1,6) vezama i hemijski se može opisati kao galaktomanan. To je beli do beličasto-žuti prašak, bez mirisa. Guar guma je polimer koji se disperguje u vrućoj i hladnoj vodi, a praktično je nerastvorna u organskim rastvaračima. Molekulska masa se kreće oko 220000. Zbog svoje sposobnosti da u niskim koncentracijama obrazuje izuzetno viskozne rastvore, ima široku primenu u različitim industrijskim granama uključujući prehrambenu, kozmetičku, tekstilnu, industriju papira i farmaceutsku industriju [27, 29].

Guar guma ima status generalno bezbedne supstance (engl. *Generally Recognized As Safe, GRAS*) koji dodeljuje Američka uprava za hranu i lekove (engl. *US Food and Drug Administration, FDA*). U bazi ekscipijenasa koju vodi FDA, guar guma se nalazi u sastavu tečnih i čvrstih preparata za oralnu primenu, bukalnih tableta, losiona za spoljašnju primenu, kapi za oči tipa suspenzija i vaginalnih tableta [50]. Guar guma u sastav navedenih preparata ulazi najčešće kao bioadhezivni materijal, sredstvo koje modifikuje mehanizam i/ili brzinu oslobađanja lekovite supstance iz farmaceutskog oblika, vezivno sredstvo i dezintegrator kod tableta i kapsula, pomoćna supstanca u sastavu farmaceutskih oblika za transdermalnu primenu, sredstvo za povećanje viskoziteta i dr. [27].

Hidroksipropil guar guma (slika 1.9) predstavlja najčešće korišćeni derivat guar gume zbog značajno unapređenih karakteristika koje se postižu kontrolisanim procesom eterifikacije guar gume sa propilenoksidom. Stepenn molarne supstitucije (SMS) predstavlja količinu jedinica propilenoksida dodatih na osnovni polimerni lanac guar gume. Ovo karakteristično svojstvo utiče na intermolekulske interakcije, dok molekulska masa hidroksipropil guar gume određuju njene fizičko-hemijske i funkcionalne karakteristike. Stoga, SMS i molekulska masa moraju biti kontrolisane i dobro poznate [51].

Hidroksipropil supstitucija primarno utiče na intermolekulske interakcije polimera do kojih dovode sile različite hemijske prirode. Prva od njih je obrazovanje vodoničnih veza koje predstavljaju privlačne sile koje dovode do međusobne agregacije polimernih lanaca. Drugi, suprotni fenomen, potiče od sternih efekata bočnih hidroksipropil grupa koji blokiraju vodonično vezivanje manoze. Hidroksipropil supstitucija povećava rigidnost i dužinu polimernih lanaca. Konačno, postoje hidrofobni efekti između samih supstituisanih grupa koji nisu značajni pri sobnoj temperaturi, ali dolaze do izražaja pri povišenim temperaturama i višim stepenima supstitucije. Postoje tri regiona SMS: u prvom regionu ($0 < SMS < \sim 0,4$) dolazi do naglog smanjenja intermolekulskih interakcija u funkciji SMS; u drugom regionu ($\sim 0,4 < SMS < \sim 1,0$) intermolekulske interakcije više nisu u funkciji SMS; u trećem regionu ($MS > \sim 1,0$) inter- i intrahidrofobni efekti mogu biti značajni samo pri višim temperaturama ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) [51].

Supstituisani oblik guar gume ima značajno niži viskozitet od prirodnog oblika. Pored toga, supstituisani oblik guar gume ima značajno bolju rastvorljivost u vodi od guar gume prirodnog porekla. Hidroksipropil guar guma se koristi u lubrikantnim kapima za oči i u rastvorima veštačkih suza [29, 51-53]. S obzirom na to da je hidroksipropil guar guma hidrofilni nejonski polisaharid, kompatibilna je sa katjonskim konzervansima koji se najčešće koriste za konzervisanje tečnih farmaceutskih oblika namenjenih za primenu na oku [54].



Slika 1.9. Strukturna formula hidroksipropil guar gume [55]

Hidroksipropil guar guma ulazi u sastav formulacija gelirajućih kapi za njegu i vlaženje oka sa demulcentima kao što su polietilenglikol 400 i propilenglikol koji oblažu sluzokužu i štite je od iritacije i inflamacije (na tržištu se nalazi kao Systane[®], kapi za oči, Alcon Laboratorija, SAD) [53, 54]. Potencijalne uloge hidroksipropil guar gume u ovom i sličnim preparatima su: (a) povećavanje viskoziteta suznog filma što dovodi do produžavanja vremena zadržavanja kapi za oko na površini, (b) smanjenje trenja tokom pokretanja očnih kapaka, (c) mogućnost adsorbovanja na hidrofobne površine ćelija čineći ih hidrofiličnijim [56]. Smatra se da hidroksipropil guar guma poseduje sposobnost specifičnog vezivanja (adhezije) za oštećene površine oka, te da zajedno sa demulcentima pokazuje odgovarajuće pozitivne efekte u terapiji sindroma suvog oka [2, 57].

Na osnovu sprovedenih istraživanja [57], pretpostavlja se da nakon primene ovog lubrikansa dolazi do povećanja viskoziteta i obrazovanja gela, usled intermolekulskih interakcija iniciranih promenom pH vrednosti i boratnim jonima koji ulaze u sastav formulacije. Ova mala promena pH vrednosti je dovoljna da pokrene stvaranje mekog gela koji zadržava demulcente u mikrookolini površine rožnjače mnogo duže nego što bi to inače bio slučaj [57]. Kapi koje sadrže ovaj mukomimetički viskozni polimer smanjuju površinsko trenje i time značajno doprinose ublažavanju simptoma suvog oka. Stupajući u interakciju sa lipidima iz suznog filma, hidroksipropil guar guma sprečava isparavanje suza i može unaprediti stabilnost suznog filma [58, 59].

U toku formulacije oftalmoloških preparata mogu se koristiti i kombinacije polimera koji ispoljavaju sinergistički efekat na viskozitet i reološko ponašanje ili omogućavaju izraženija mukoadhezivna svojstva. Potvrđeno je da kombinacija hijaluronske kiseline i hitozana, ali i hijaluronske kiseline i polisaharida iz semena tamarinda (lat. *Tamarindus indica*) ispoljavaju sinergistički mukoadhezivni efekat [60, 61]. Prisustvo želatine poboljšava mukoadhezivna svojstva karagenana [62] i hijaluronske kiseline usled nastanka rastvorljivog proizvoda polimer-polimer interakcije [20]. Kombinacija trehaloze i hijaluronske kiseline umanjuje isušivanje membranskih lipida i proteina i poboljšava viskoelastičnost suznog filma [63]. U *in vitro* studiji na kultivisanim humanim ćelijama epitela rožnjače, potvrđen je pozitivan efekat kombinovanja hijaluronske kiseline i hidroksipropil guar gume u odnosu na primenu pomenutih polimera pojedinačno. Kombinacija polimera omogućila je efikasniju hidrataciju i lubrikaciju, odnosno smanjenje isušivanja u dužem vremenskom periodu u odnosu na pojedinačne polimere [64]. Takođe, u literaturi postoje potvrde o pozitivnom reološkom sinergizmu ksantan gume i guar gume koje međusobnom interakcijom doprinose dužem zadržavanju preparata na mestu primene i boljoj okularnoj raspoloživosti [27, 65]. Kombinacijom dva ili više polimera moguće je postići više pozitivnih efekata, značajnije doprineti viskozitetu i lubrikaciji, uz smanjenje koncentracije pojedinačnih polimera i na taj način umanjiti mogućnost pojave neželjenih efekata i troškove potrebnih sirovina [66].

1.2.2 Upotreba pojačivača penetracije

Supstance za poboljšanje penetracije se ponekad dodaju u oftalmološke preparate radi modifikovanja permeabilnosti epitela rožnjače. Osnovna kategorizacija pojačivača penetracije predstavlja podelu na: (a) helatne agense (limunska kiselina, EDTA), (b) surfaktante (natrijum-lauril sulfat, cetilpiridinium-hlorid, benzalkonijum-hlorid, Tween 20, estri parahidroksibenzojeve kiseline), (c) ciklodekstrini, (d) žučne soli (natrijum-glikolat), (e) masne kiseline (oleinska i kaprilna kiselina) [67].

Mehanizmi kojima pojačivači penetracije poboljšavaju okularnu raspoloživost uključuju smanjenje barijerne funkcije mukoznih membrana oka privremenim menjanjem strukture ili svojstava ovih membrana. Osnovna tri mehanizma kojim deluju pojačivači penetracije su modifikovanje stabilnosti suznog filma i mukusnog sloja, povećanje propustljivosti ćelijskih membrana i slabljenje čvrstih međućelijskih veza. Većina ovih supstanci deluje istovremeno putem više mehanizama [6, 67].

Surfaktanti svojim mukolitičkim ponašanjem indukuju prolaznu modifikaciju u strukturi i propustljivosti membrane delujući na lipidne dvosloje, ali stvaraju i međućelijske kanale ili pore ometajući čvrste veze čime olakšavaju transport molekula kako transćelijskim, tako i paraćelijskim putem [4, 6, 17]. Pored toga, poznato je da surfaktanti smanjuju veličinu kapi tečnih oftalmoloških preparata [1, 6]. Benzalkonijum-hlorid poseduje izražen efekat povećanja penetracije [17, 67]. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je potvrđeno da benzalkonijum-hlorid povećava pasivnu difuziju aktivnih supstanci tako što remeti membrane epitelnih ćelija rožnjače [2, 6].

Ciklodekstrini deluju kao nosači hidrofobnih lekovitih supstanci jer kompleksiraju hidrofobne molekule i isporučuju ih epitelu rožnjače bez ometanja integriteta rožnjače, za razliku od drugih pojačivača penetracije. Međutim, u višim koncentracijama ciklodekstrini ispoljavaju toksične efekte jer mogu da reaguju sa sastojcima bioloških membrana, kao što su holesterol i fosfolipidi. Pored toga, kod pacijenata sa sindromom suvog oka, mogu dovesti do daljeg sušenja očnih kapaka [4].

Većina hemijskih pojačivača penetracije, naročito surfaktanti i helatni agensi, nakon intenzivne primene, potencijalno mogu izazvati neželjene i toksične efekte. Usled njihovog akumuliranja u rožnjači, može doći do stvaranja lezija u kojima dolazi do razvoja infekcije, ali i do mehaničkih oštećenja, te moguće iritacije. Stoga je neophodno koristiti najmanje koncentracije potrebne da dovedu do očekivanog efekata, a izazovu iritaciju, osećaj neprijatnosti ili oštećenje [6, 68].

Lokalna primena preparata koji u svom sastavu pored pojačivača penetracije sadrže i mukoadhezivne polimere omogućava poboljšanu efikasnost leka u nižim koncentracijama i produženu isporuku uz smanjenje toksičnosti i minimalne neželjene efekte. Mukoadhezivni polimeri kao što su hitozan, hijaluronska kiselina i alginat omogućavaju optimalnu aktivnost pojačivača penetracije uz istovremeno ublažavanje narušavanja integriteta epitela i smanjenje mogućnosti iritacije [67].

1.3 SINDROM SUVOG OKA I ALERGIJSKI KONJUNKTIVITIS

Sindrom suvog oka i alergijski konjunktivitis su dva najčešća inflamatorna poremećaja prednjeg segmenta oka i smatraju se epidemijama 21. veka. Tradicionalno, sindrom suvog oka i alergijski konjunktivitis posmatrali su se kao dva različita oboljenja, međutim, noviji literaturni podaci ukazuju na sličnost i preklapanja ova dva stanja u pogledu pojave sličnih simptoma [69-71].

Sindrom suvog oka predstavlja multifaktorsku bolest suza i površine oka, koja dovodi do osećaja neprijatnosti, poremećaja vida i nestabilnosti suznog filma sa potencijalnim oštećenjem površine oka, često praćenih povećanjem osmolarnosti suznog filma i zapaljenjem površine oka [72]. Na osnovu novih saznanja, definicija sindroma suvog oka je revidirana i sada glasi:

“Sindrom suvog oka je multifaktorska bolest površine oka koju karakterišu gubitak homeostaze suznog filma, praćen simptomima od kojih nestabilnost i hiperosmolarnost suznog filma, zapaljenje i oštećenje površine oka i neurosenzorne abnormalosti, igraju etiološku ulogu.” [73].

Narušena homeostaza suznog filma uključujući kvantitativni i kvalitativni nedostatak suza posledično dovodi do smanjene vlažnosti, povećanja trenja, hiperosmolarnog stresa i hronične mehaničke iritacije površine oka [74]. Najčešći simptomi su osećaj suvoće, svraba, prisustva stranog tela, bolnost, crvenilo i hiperemija [69, 75]. Mogući razlozi razvoja sindroma suvog oka su smanjena proizvodnja suza i/ili povećanje njihovog isparavanja. Učestalost sindroma suvog oka, koji se još naziva suvi keratokonjunktivitis, u populaciji se kreće 5–35%, a najzastupljeniji je kod starijih osoba i žena u postmenopauzi [15, 69]. Patogeneza sindroma suvog oka povezana je sa citotoksičnim medijatorima upale, izmenjenom funkcijom suznih žlezda i nerava, metaplazijom skvamoznog epitela konjunktive i smanjenjem broja peharastih ćelija, a sve to igra značajnu ulogu u oštećenju epitela rožnjače i konjunktive [76]. Bez odgovarajuće lubrikacije, dolazi do značajnog oštećenja ćelija na površini oka što vodi pogoršanju inflamatornog procesa [77].

Trenutno, terapija suvog oka najčešće podrazumeva upotrebu veštačkih suza i antiinflamatornih lekova [58]. Okularni lubrikansi predstavljaju prvu liniju terapije sindroma suvog oka i mogu da spreče pojavu začaranog inflamatornog kruga [77]. Lubrikansi zapravo podrazumevaju supstance koje smanjuju trenje tokom upotrebe. U konkretnom slučaju, lubrikantni efekat podrazumeva smanjenje trenja između površine oka i kapaka [27]. Tretman suvog oka se u velikoj meri u svetu sprovodi farmaceutskim preparatima koji se izdaju bez lekarskog recepta (engl. *over-the-counter*, *OTC*), a prema regulativi Republike Srbije najčešće su registrovani kao medicinska sredstva. Ovi proizvodi se sreću pod različitim nazivima: kao veštačke suze, okularni lubrikansi, demulcenti, sredstva za vlaženje ili za vlaženje i negu oka, a dostupni su u obliku rastvora (kapi za oči), gelova ili ređe masti [23, 53, 58, 78].

Navedeni preparati namenjeni za lokalnu primenu primenjuju se direktno na površinu oka i ekscipijensi koji se koriste u ovim formulacijama igraju značajnu ulogu u rešavanju kvantitativnog i kvalitativnog nedostatka suza. Najzastupljenija pomoćna supstanca u lubrikantnim kapima za oči je voda kao vehikulum, uz dodatak sredstava za povećanje viskoziteta radi poboljšanja lubrikacije i produžavanja vremena zadržavanja na površini oka [79]. Kao sredstva za povećanje viskoziteta, najčešće se koriste hidrofilni polimeri kao aktivne supstance koje štite i podmazuju površinsku mukusnu membranu konjunktive i rožnjače, smanjujući trenje, čime omogućavaju privremeno olakšanje simptoma suvoće i iritacije. Polimeri dovode do povećanja viskoziteta suznog filma čime vrše njegovu stabilizaciju, smanjuju gubitak suza i deluju kao zaštita tkiva [2, 23, 80]. Dodatno, potencijalni mehanizmi delovanja okularnih lubrikanasa su i dopunjavanje volumena suza, te smanjenje osmolarnosti suzne tečnosti [80].

Mucin je prirodna „podmazujuća“ komponenta suza koja daje viskozitet suznom filmu, pa se samim tim očekuje da preparati koji se koriste u tretmanu suvog oka ispoljavaju mukomimetički efekat. Ovi preparati se međusobno razlikuju po izboru polimera ili kombinacije polimera, njihovoj koncentraciji, dužini delovanja, viskozitetu, osmolarnosti/osmolalnosti i pH vrednosti [3, 23]. Viskozniji preparati mogu da obezbede dugotrajno olakšanje, međutim, kod izrazito viskoznih postoji i veća mogućnost da dođe do zamućenja vida ili zaostajanja polimera na kopcima. Pomoćne supstance koje ulaze u sastav proizvoda namenjenih suvom oku su slične onima koje se koriste u oftalmološkim preparatima i zahtevaju podjednako pažljiv izbor, stoga moraju biti fiziološki kompatibilni i ne smeju dovoditi do iritacije oka. Većina pomenutih proizvoda je konzervisana i kao kod lekovitih preparata, najčešće korišćeni konzervansi je benzalkonijum-hlorid [23].

Najveći nedostatak preparata koji se koriste u tretmanu suvog oka i dalje je kratko vreme zadržavanja na mestu primene i kratkotrajan efekat otklanjanja simptoma. Zbog toga se intenzivno istražuju različiti pristupi u tretmanu sindroma suvog oka i nove formulacije koje uključuju novije polimere i njihove kombinacije [23, 58, 81].

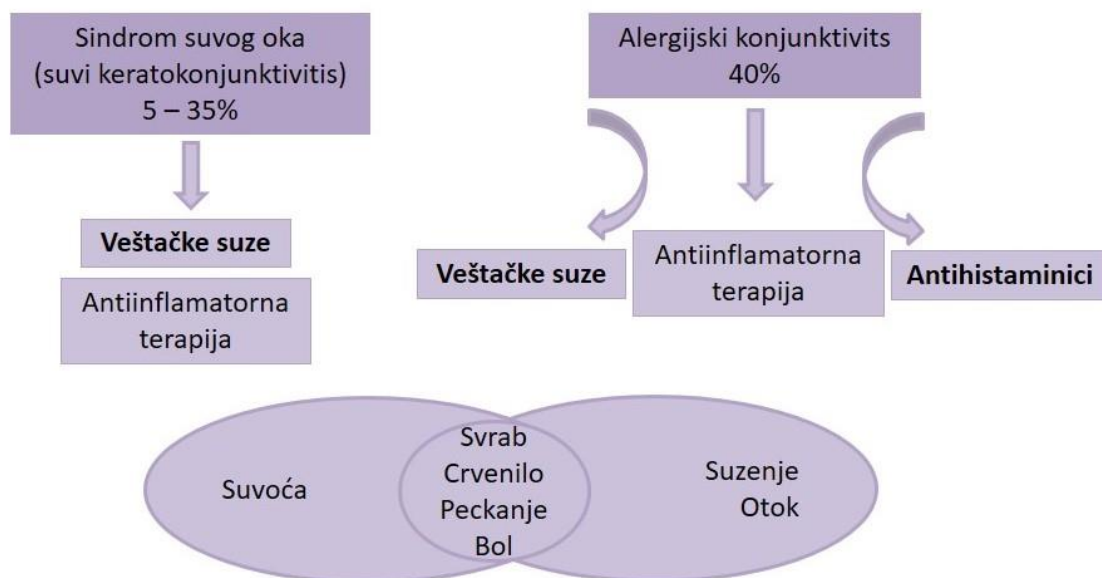
Alergijski konjunktivitis je skup inflamatornih procesa oka posredovanih aktivacijom mastocita koji zahvataju konjunktivu, kapke i rožnjaču. Neretko se javlja zajedno sa ostalim alergijskim bolestima uključujući astmu, atopijski dermatitis i rinitis. Alergije na oku su primarno posredovane aktivacijom i degranulacijom mastocita kao posledica interakcije IgE sa alergenom, uz uključivanje T limfocita. Aktivacija mastocita odvija se u dve faze: akutna faza koja se javlja u roku od nekoliko minuta i kasna faza koja traje od 6 do 72 sata nakon izlaganja alergenom. Reakcija u

akutnoj fazi nastaje usled oslobađanja histamina i medijatora nakon umrežavanja antigen specifičnih IgE antitijela na površini mastocita. Reakciju u kasnoj fazi karakteriše oslobađanje hemokina, monocitnog hemoatraktantnog proteina-3, makrofagnog inflamatornog proteina, te infiltracija eozinofila, bazofila, T ćelija, neutrofila i makrofaga koji generišu spektar drugih medijatora, što dovodi do upale konjunktive. Pored histamina, triptaze i drugih proteaza, u patogenezi alergijskog zapaljenja površine oka učestvuju metaboliti arahidonske kiseline (leukotrieni, prostaglandini), citokini, hemokini, faktori rasta i adhezivne molekule. Simptomi akutne alergije oka uključuju svrab, crvenilo, suzenje i oticanje [69, 82].

Osnovna terapija u lečenju alergijskog konjunktivitisa su oralni i lokalni antihistaminici uz uključivanje topikalnih kortikosteroida za refraktarne forme. Oftalmološki NSAID, kao što je ketorolak, ispoljavaju antipruritusno dejstvo smanjujući nivo prostaglandina u suznom filmu, ali mogu da dovedu do smanjenja komplijanse usled izazivanja osećaja peckanja. Prva generacija antihistaminika, zbog svog antiholinergičkog dejstva, može izazvati pojavu simptoma sindroma suvog oka kod pacijenata sa alergijskim konjunktivitisom koji su već predisponirani za to stanje, dok savremeniji stabilizatori mastocita ispoljavaju bolju efikasnost uz manje pratećih neželjenih efekata [77].

Svrab je simptom koji služi za diferencijaciju alergijskog konjunktivitisa od drugih oblika konjunktivitisa. Kada su simptomi svraba klinički značajni, postoji velika mogućnost da će oči biti crvene i suve [83]. Pored toga, u studiji koju su sprovedi Hom i sar. [69] pokazano je da i pacijenti sa sindromom suvog oka imaju veće šanse za pojavu svraba i eritema što ukazuje na značajno preklapanje simptoma ova dva oboljenja što otežava diferencijalnu dijagnostiku. Utvrđeno je da alergijski konjunktivitis dovodi do promena u sastavu suznog filma što je, kao što je ranije pomenuto, povezano sa sindromom suvog oka ili čini pacijente koji boluju od alergijskog konjunktivitisa predisponiranim za pojavu sindrom suvog oka. Pored toga, svrab posledično dovodi do trljanja oka, što može narušiti integritet epitela rožnjače, te pogoršati stanje upale na površini oka i dovesti do pojave osećaja bola [84]. Kod hroničnog oblika alergijskog konjunktivitisa, dolazi do učestalog pucanja suznog filma, smanjenja sadržaja konjunktivalnog mucina kao jednog od slojeva suzne tečnosti i smanjenja broja peharastih ćelija u konjunktivi što sve zajedno dovodi do suvoće oka. Pucanje suznog filma je direktno povezano sa smanjenjem broja peharastih ćelija [69].

Na osnovu svega navedenog, sindrom suvog oka i alergijski konjunktivitis klinički imaju slične simptome (svrab, crvenilo, peckanje, bol) i podsećaju jedan na drugi (slika 1.10).



Slika 1.10. Učestalost, terapija i simptomi sindroma suvog oka i alergijskog konjunktivitisa

1.4 MODEL LEKOVITE SUPSTANCE

1.4.1 Antihistaminici u terapiji sindroma suvog oka i alergijskog konjunktivitisa

Lokalna oftalmološka primena antagonista H1 receptora ublažava simptome alergijskog konjunktivitisa kao što su svrab, kongestija konjunktive i eritem. Gustina mastocita u konjunktivi je velika, a koncentracija histamina je vrlo visoka u suznoj tečnosti u toku alergijskog odgovora. Aktivacijom mastocita dolazi do oslobađanja histamina, sinteze i oslobađanja medijatora upale kao što su prostaglandin D₂, leukotrien C₄, triptaze, himaze, karboksipeptidaze-A, katepsin-G, faktor aktivacije trombocita i drugi hemoatraktanti koji dovode do regrutovanja eozinofila i neutrofila. Na osnovu korelacija pK_a vrednosti i lipofilnosti, pretpostavlja se da su lekovite supstance sa logD (zbir koeficijentata raspodele jonizovanog i nejonizovanog oblika) blizu 1,0 ± 0,5 pri pH 7,4 najefikasnije u otklanjanju simptoma, te da njihove soli retko izazivaju iritaciju oka [85].

U tabeli 1.1 prikazani su odabrani komercijalno dostupni topikalni preparati koji sadrže antihistaminike dvostrukog mehanizma dejstva.

Tabela 1.1. Pregled komercijalno dostupnih proizvoda koji sadrže antihistaminike dvostrukog mehanizma dejstva [52, 78, 86]

Lekovita supstanca	Naziv leka	Sadržaj lekovite supstance	Način primene	Proizvođač/ Zemlja	Registrovan na tržištu		
					RS	EU	SAD
Ketotifen	Zaditen®	0,25 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	Thea Laboratories/ Francuska	-	+	-
	Zaditor	0,25 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	ALCON PHARMS LTD	-	+	+
	Ketotifen Stulln Unit Dose	0,25 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	PHARMA STULLN GMBH/Holandija	-	+	-
Azelastrin	Allergodil®	0,5 mg/ml	1 kap u oko 2 do 4 puta dnevno	MEDA PHARMA GMBH & CO. KG/ Nemačka	+	+	-
	Pollival®	0,5 mg/ml	1 kap u oko 2 do 4 puta dnevno	URSAPHARM ARZNEIMITTEL GMBH/Nemačka	+	+	-
	Azelastine hydrochloride	0,5 mg/ml	1 kap u oko 2 do 4 puta dnevno	AKORN/SAD	-	-	+
Epinastin	Relestat®	0,5 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	ALLERGANPHARM ACEUTICALS/Irska	-	+	-
	Epinastine hydrochloride	0,5 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	AKORN/SAD	-	-	+
Olopatadin	Opatanol®	1 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	ALCON-COUVREUR N.V./Belgija	+	+	-
	Pana®	1 mg/ml	1 kap u oko 2 puta dnevno	HEMOFARM AD VRŠAC/ Republika Srbija	+	-	-
	Pataday®	2 mg/ml	1 kap u oko 1 dnevno	ALCON LABORATORIES, INC./SAD	-	-	+

Antihistaminici dvostrukog mehanizma delovanja (engl. *dual-action drugs*) kombinuju efekat blokade histaminskih receptora i stabilizacije mastocita sprečavajući oslobađanje medijatora upale. Na taj način ne samo da otklanjaju simptome, nego i smanjuju učestalost ponovnog javljanja alergijskih epizoda, te su značajni i za kasnu fazu alergijskog odgovora prednjeg segmenta oka. Predstavnicima ove grupe lekova su ketotifen, azelastrin, epinastin i olopatadin [15, 82], od kojih su

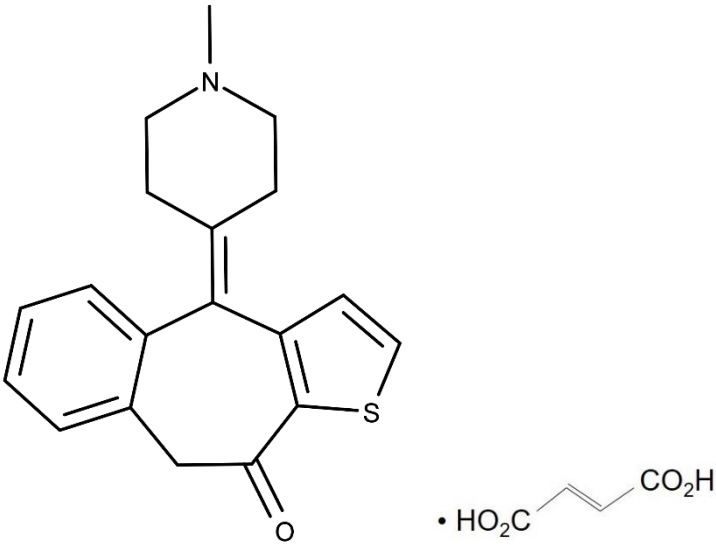
ketotifen i olopatadin korišćeni kao model supstance koje su predmet istraživanja ove disertacije. Obe lekovite supstance ulaze u sastav registrovanih preparata, kapi za oči u obliku rastvora, i namenjene su za terapiju alergijskog konjunktivitisa. Najčešći neželjeni efekti antihistaminika dvostrukog mehanizma dejstva su bol u oku, iritacija oka, osećaj prisustva stranog tela i suvo oko [15].

Nakon primene antihistaminika lokalno u obliku kapi za oči, samo mala količina (od 1% do 5%) lekovite supstance penetrira kroz rožnjaču. Ostatak leka bude apsorbovan preko konjunktive i sluznice nosa, a u najvećoj meri progutan nakon prolaska kroz nazolakrimalni kanal [85]. Kako bi se ovaj problem prevazišao, kapi za oči se obično propisuju sa velikom učestalošću doziranja, što dovodi do loše komplijanse, a naročit problem nastaje kod hroničnih stanja. Zbog toga je fokus savremenih istraživanja na unapređenju konvencionalnih farmaceutskih oblika i razvoju novih, potencijalno unapređenih nosača kojima bi se postiglo produženo zadržavanje leka na površini oka [25, 87, 88].

1.4.1.1 Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba ketotifen-hidrogenfumarata

Ketotifen-hidrogenfumarat (KF) je selektivni antagonist H1 receptora koji inhibira oslobađanje histamina i medijatora upale iz mastocita. Može sprečiti infiltraciju, aktivaciju i degranulaciju eozinofila. Koristi se kod različitih stanja kao što su astma, alergijski rinitis i alergijski konjunktivitis. Za razliku od jedinjenja kromolina (npr. natrijum-kromoglikat, nedokromil), ujedno vrši stabilizaciju mastocita i deluje kao antagonist H1 receptora, ali i inhibira stvaranje leukotriena [82]. Strukturna formula i osnovne osobine KF navedene su u tabeli 1.2.

Tabela 1.2. Hemijska struktura i osobine ketotifen-hidrogenfumarata [43, 91]

Strukturna formula	
IUPAC nomenklatura	4-(1-metilpiperidin-4-iliden)-4,9-dihidro-10H-benzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]tiofen-10-on hidrogen(E)-fumarat
Molekulska formula	C ₂₃ H ₂₃ NO ₅ S
Mr	425,5
Osobine	Beli ili braonkasto-žuti fini kristalni prašak, umereno rastvorljiv u vodi, teško rastvorljiv u metanolu, vrlo teško rastvorljiv u acetonitrilu
logP	3,55
Tačka topljenja	190 °C
CAS broj	34580-14-8

Ketotifen je baza, pKa vrednosti 8,43. Primenjuje se u obliku fumarata, ali se sadržaj aktivne supstance uobičajeno izražava u odnosu na bazu, odnosno 1,38 mg ketotifen-fumarata je ekvivalentno 1 mg ketotifena [89]. Izračunata vrednost koeficijenta distribucije/raspodele (log D), kao mera lipofilnosti za ketotifen pri pH 5,5 (predviđena pH vrednost vehikuluma) iznosi 1,43 [90].

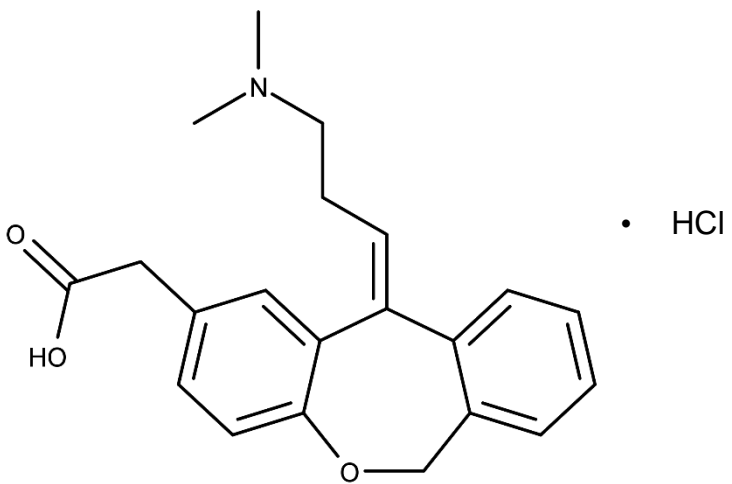
Ketotifen se koristi u najnižoj koncentraciji 0,025 % (m/V), u odnosu na ostale predstavnike grupe antihistaminika sa dvostrukim mehanizmom delovanja. Za razliku od ostalih predstavnika, ketotifen je jedini dostupan u jednodoznom kontejneru bez konzervansa, te je naročito pogodan za pacijente koji nose kontaktna sočiva (tabela 1.1).

U literaturi postoji samo nekoliko istraživanja koja se bave unapređenjem konvencionalnih farmaceutskih oblika i formulacijom novijih nosača sa KF, a sve u cilju dužeg zadržavanja leka na površini oka i poboljšanja okularne raspoloživosti. Pre svega to se odnosi na uključivanje polimera (hijaluronska kiselina i polisaharidi iz semena tamarinda) u rastvore lekovite supstance, kao i na formulaciju *in situ* gelirajućih sistema koji sadrže neki od polimera podložnih faznom prelazu iz rastvorenog u gel stanje pod uticajem promene uslova u njihovom okruženju (temperatura, pH ili jonski sastav sredine) (npr. deacetilovana gelan guma) [60, 92].

1.4.1.2 Fizičko-hemijske osobine, delovanje i upotreba olopatadin-hidrohlorida

Olopatadin-hidrohlid (OLO) je triciklično jedinjenje koji sadrži alkilamino i karboksilnu grupu (tabela 1.3). Selektivni je antagonist H1 receptora koji poseduje osobine stabilizacije mastocita, a pokazao je i sposobnost inhibicije različitih citokina. Afinitet za H1 receptore je značajno viši u odnosu na H2 i H3 receptore, a selektivnost za histaminske receptore je značajno izražena i u odnosu na α -adrenergičke, dopaminergičke, serotonergičke i muskarinske receptore. Prisustvo karboksilne grupe je očigledno odgovorno za slab afinitet prema muskarinskim receptorima [85].

Tabela 1.3. Hemijska struktura i osobine olopatadin-hidrohlorida [91, 93]

Strukturna formula	
IUPAC nomenklatura	(11Z)-11-[3-(dimetilamino) propiliden]-6,11-dibenzo [b,e] oksepin-2-il-sirćetna kiselina, hidrohlorid
Molekulska formula	C ₂₁ H ₂₃ NO ₃ · HCl
Mr	373,9
Osobine	Beli kristalni prašak, umereno rastvorljiv u vodi, vrlo teško rastvorljiv u anhidrovanom alkoholu, vrlo lako rastvorlji u mravljivoj kiselini.
log P	0,75
Tačka topljenja	250-254 °C
CAS broj	140462-76-6

Komercijalno je dostupan u obliku kapi za oči u tri različite terapijske koncentracije (0,1%, 0,2% i 0,7%) [82]. Na tržištu su najzastupljenije kapi za oči koje sadrže 0,1% olopatadin baze indikovane za lečenje alergijskog konjunktivitisa i kao takve primenjuju se dva puta dnevno. Alternativno, kapi za oči sa 0,2% olopatadin baze primenjuju se jednom dnevno (tabela 1.1). Olopatadin ima dve pKa vrednosti, pKa1 (jaka kiselina) koja iznosi 3,78, te pKa2 (jaka baza) 9,76 [91]. Izračunata vrednost koeficijenta distribucije/raspodele (log D) pri pH 5,5 iznosi 0,74 [90].

Olopatadin se primenjuje u najvišoj koncentraciji u odnosu na ostale predstavnike lekova dvostrukog mehanizma dejstva. Pokazano je da nema značajne razlike u efikasnosti otklanjanja simptoma svraba olopatadina u odnosu na ketotifen [94], osim toga što olopatadin brže deluje i bolje se podnosi [95].

S obzirom da je olopatadin najnoviji lek iz ove grupe lekova, u literaturi je prisutan mali broj istraživanja na polju razvoja novih formulacija ili unapređenja postojećih u cilju poboljšanja okularne raspoloživosti. Uspešno je formulisan *in situ* gel sa gelan gumom i karbopolom [88] čime je postignut sinergistički efekat (poboljšane gelirajuće karakteristike) na površini oka i jedan termosenzitivni gel na bazi poloksamera 407 i poloksamera 188 [96].

1.5 METODE KARAKTERIZACIJE OFTALMOLOŠKIH PREPARATA

Ph. Eur 10.0 u monografiji *Ophthalmica* propisuje sledeće farmaceutske oblike: kapi za oči, losione za oči, praškove za kapi za oči, praškove za losione za oči, polučvrste preparate i oftalmološke inserte. Opšte ispitivanje za sve preparate za oči (Ph. Eur. 10.0) je ispitivanje sterilnosti (Ph. Eur. 2.6.1), dok se kod pojedinih vrsta preparata za oči navode: veličina čestica (*Kapi za oči* i *Polučvrsti preparati za oči*), ujednačenost doznih jedinica (*Praškovi za kapi za oči*, *Praškovi za losione za oči* i *Oftalmološki inserti*) i ujednačenost sadržaja (*Oftalmološki inserti*).

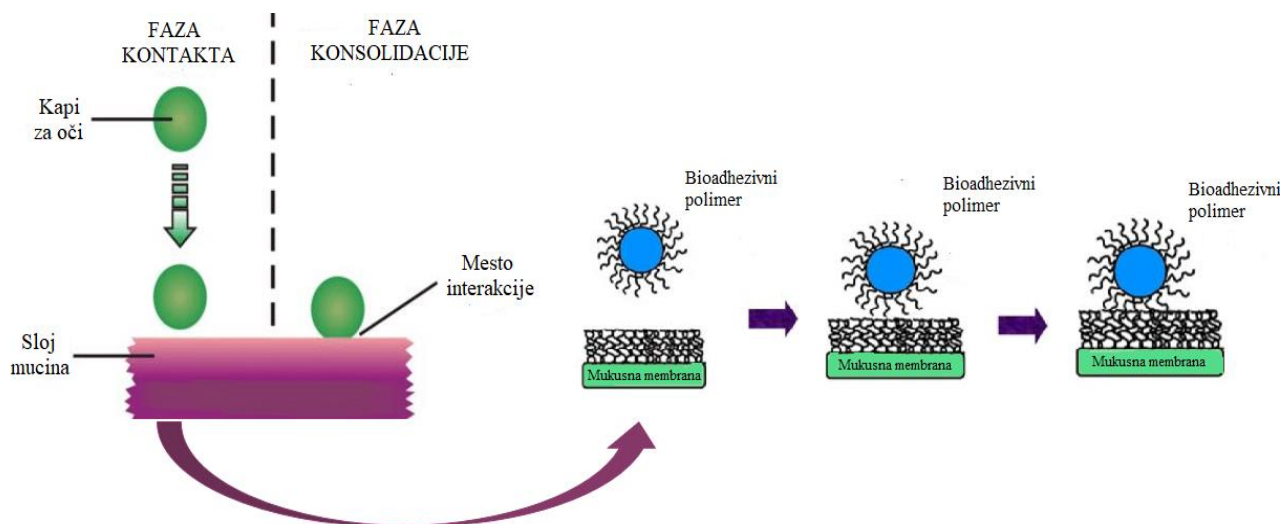
Pored navedenih ispitivanja u okviru procene kvaliteta preparata za oči uobičajeno se sprovode ispitivanja: identifikacije, izgleda i bistrine, sadržaja lekovite supstance, pH vrednosti, osmolalnosti, određivanje sadržaja konzervansa i antioksidansa, ujednačenost mase, ujednačenost doznih jedinica [2].

Modifikacije konvencionalnih farmaceutskih oblika i razvoj savremenih nosača zahteva primenu novih metoda analize u cilju što potpunije farmaceutsko-tehnološke i biofarmaceutske karakterizacije. U zavisnosti od farmaceutskog oblika mogu se sprovesti i dodatna ispitivanja kao što su ispitivanje efikasnosti inkapsulacije, interakcija između lekovite supstance i nosača, mogućnost formiranja gela kod *in situ* gelirajućih sistema, mukoadhezivnosti, *in vitro/ex vivo* transkornealna permeacija, a sprovode se i testovi citotoksičnosti/biokompatibilnosti i iritacije [97].

Poznato je da dodavanje sredstava za podešavanje viskoziteta formulacijama kapi za oči u značajnoj meri može poboljšati okularnu raspoloživost lekovite supstance jer produžava njeno zadržavanje na mestu primene. Praćenjem viskoziteta kapi za oči, moguće je odrediti odgovarajuće koncentracije polimera kako bi se postigao optimalan efekat na zadržavanje preparata, a izbegli neželjeni efekti na površini oka, poput zamagljenja vida ili otežanog treptanja. Tako dobijeni viskozni rastvori najčešće poseduju pseudoplastična svojstva, odnosno vremenski zavisno proticanje (engl. *shear thinning*) i ponekada je teško napraviti razliku između izrazito viskoznih rastvora i gelova. Iz tog razloga značajna su ispitivanja viskoziteta i tipa tečenja na ovaj način modifikovanih formulacija kapi za oči. Viskozni rastvori koji sadrže hidrofilne polimere, najčešće predstavljaju tečnosti koje ispoljavaju nenjutnovski tip tečenja.

Svojstvo polimera da adherira za biološke membrane je značajnije sa aspekta povećanja okularne raspoloživosti od njihove sposobnosti da dovode do povećanja viskoziteta, jer se tečni preparati nižeg viskoziteta bolje podnose na oku. Sposobnost polimera da stupaju u nekovalentne interakcije sa mucinom omogućava njihovo adheriranje za kornealne i konjunktivalne površine oka. Ovo svojstvo polimera omogućava duže zadržavanje primenjenog tečnog preparata na površini oka, manji gubitak usled drenaže, bolju penetraciju lekovitih supstanci ili dužu lokalnu aktivnost [10, 24].

Nastanak fenomena mukoadhezije uobičajeno se objašnjava kroz dve sukcesivne faze (slika 1.11). U prvoj fazi, dolazi do uspostavljanja kontakta između mukoadhezivnog polimera i biološke podloge (u ovoj fazi ključnu ulogu igraju sposobnost polimera da se rasprostire po biološkoj podlozi i međufazne sile); u drugoj fazi koja se može definisati kao faza konsolidacije u kojoj dolazi do fizičke interakcije i obrazovanja sekundarnih hemijskih veza između mukadhezivnog polimera i mukusa koji se nalazi na površini sluzokože. U slučaju mukoadhezivnih polimera, ovoj fazi prethodi međusobna interpenetracija polimernih lanaca i glikoproteina mucina [98].



Slika 1.11. Šematski prikaz mehanizma mukoadhezije (prilagođeno iz [99])

Za procenu mukoadhezivnih karakteristika koriste se različite *in vitro* i *in vivo* metode [100-102].

Jedna od jednostavnih, jeftinih i lako izvodivih metoda je turbidimetrijska. Metoda se zasniva na merenju turbiditeta disperzije mucina nakon inkubacije sa ispitivanim uzorkom. Nakon mešanja rastvora polimera sa disperzijom mucina, u slučaju interakcije, dolazi do pojave precipitata i promene turbiditeta u odnosu na turbiditet disperzije mucina [100, 103].

Metoda merenja zeta potencijala koja se još naziva mucin čestična metoda (engl. *mucin particle method*) je korisna tehnika procene mukoadhezivnih karakteristika u slučaju polimera koji stupaju u elektrostatičke interakcije sa mucinom. Zasniva se na promeni zeta potencijala disperzije mucina nakon inkubacije sa polimerom koji ima afinitet za interakciju sa mucinom [100, 104].

Reološki pristup procene sposobnosti polimera da adherira za mukozne membrane zasniva se na merenju povećanja viskoziteta ili viskoelastičnosti nakon njegovog mešanja sa disperzijom mucina [105]. Sila mukoadhezije procenjuje se na osnovu promena viskoziteta u sistemu gde se energija interakcije može transformisati u rad, što rezultuje preraspodelom makromolekula i promenom viskoziteta. Stoga, mukoadhezivnost se detektuje kada je reološki odgovor smeše polimer-mucin veći od doprinosa rastvora polimera i disperzije mucina pojedinačno. Osim kontinualne reološke analize, najčešće se uporedo sprovodi i oscilatorna reološka analiza kako bi se pored viskoziteta analiziralo i elastično ponašanje uzorka [100, 105].

Pored brojnih zahteva za kvalitet koje treba da ispune kapi za oči kako bi bile fiziološki prihvatljive (pH, toničnost, viskozitet), podešavanju površinskog napona je posvećeno daleko manje pažnje. Određivanje površinskog napona kapi za oči u obliku rastvora je vrlo korisna tehnika koja omogućava procenu kompatibilnosti kapi za oči i suzne tečnosti [13]. Dodavanjem polimera u kapi za oči u obliku rastvora dolazi do povećanja njihovog viskoziteta, uz smanjenje površinskog napona. Viskozni rastvori nižeg površinskog napona lakše se rasprostiru po površini oka, bolje adheriraju za površinu rožnjače pri čemu se produžava vreme zadržavanja rastvora na oku [3, 23]. Pored svega navedenog, površinski napon može uticati na proces proizvodnje, kao i tačnost doziranja, tj. ujednačenost volumena kapi iz višedoznih kontejnera [106].

Biofarmaceutska karakterizacija oftalmoloških preparata u prošlosti se u mnogome zasnivala na upotrebi životinjskih modela, dok je poslednjih nekoliko decenija ostvaren značajan napredak u razvoju novih tehnika koje se zasnivaju na primeni *ex vivo* tkivnih, *in vitro* ćelijskih modela i *in silico* metoda [1, 107].

Ispitivanje permeabilnosti lekovitih supstanci kroz barijere oka predstavlja jedan od najznačajnijih koraka u proceni okularne raspoloživosti i/ili bioekvivalentnosti. Pomoćne supstance koje ulaze u sastav formulacije značajno utiču na permeaciju lekovitih supstanci kroz barijere oka, tako da se samo male promene u formulaciji mogu značajno odraziti na permeaciju lekovite supstance. Ćelijski i tkivni modeli su ekvivalentni modeli za određivanje okularne raspoloživosti. Ne koriste se rutinski u industriji i ne sprovode se u standardnim regulatornim protokolima zbog nedostatka validacije takvih metoda. U poslednjoj decenji, intenzivno se radilo na razvoju modela prednjeg segmenta oka (naročito modela rožnjače) [108-110].

Za predviđanje kornealne permeabilnosti koriste se različiti modeli, najčešće oni koji se zasnivaju na *ex vivo* metodama i upotrebi kičmenjaka, te *in vitro* ćelijske metode. Kod *ex vivo* metoda koriste se cele oči ili izolovane rožnjače različitih životinjskih vrsta kao što su svinja [111], koza [88], krava [112], ili zec kao membrane koja se postavlja između donorskog i akceptorskog dela modifikovane *Franz*-ove difuzione ćelije.

Kako bi se broj žrtvovanih laboratorijskih životinja sveo na minimum i izbegli problemi vezani za etička pitanja, sve više se koriste *in vitro* ćelijske metode. Modeli koji se zasnivaju na ćelijama najčešće podrazumevaju upotrebu primarnih ćelijskih kultura, besmrtnih ćelijskih linija ili rekonstruisanih kultura tkiva zečijeg ili ljudskog porekla [113].

Pored ovih, razvijeni su i različiti *in vitro* transkornealni modeli za ispitivanje permeabilnosti koji se razlikuju po tipu i poreklu ćelija (životinjske/humane), materijalu od koga su napravljene polupropustljive membrane, protokolu za uzgoj ćelija, sastavu medijuma za uzgoj i dužini trajanja kultivacije ćelija i izlaganja vazduhu [109, 110, 114, 115]. Besmrtne ćelijske linije karakteriše gotovo beskonačan životni vek usled mutacije u ćelijskom genomu koja omogućava izbegavanje procesa starenja [116]. Besmrtna ćelijska linija zasnovana na humanim epitelnim ćelijama rožnjače (engl. *human corneal epithelial cells*, HCE-T) je u najvećoj meri okarakterisana u smislu poroziteta i veličine pora formirane epitelne barijere *in vitro*, pasivnog paracelularanog i transcelularnog transporta [109, 117, 118]. Pored jednostavnosti, reproduktivnosti, ponovljivosti i mogućnosti testiranja velikog broja uzoraka, primena savremenih tehnika omogućava smanjenje troškova i vremena potrebnog za izvođenje eksperimenata. [1].

Jedna od savremenih metoda predviđanja kornealne permeabilnosti lekovitih supstanci iz testiranih kapi za oči, zasniva se na primeni veštačkih paralelnih membrana (engl. *Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay*, PAMPA). PAMPA tehnika se može smatrati korisnom alternativom u ranima fazama razvoja oftalmoloških preparata, u odnosu na skupe i vremenski zahtevne *ex vivo* i *in vitro* ćelijske metode [107, 119]. Primenom ove tehnike određuje se transcelularna permeabilnost jer je veštačka membrana zasnovana na fosfolipidnom sloju [107]. Uzimajući u obzir da je epitelni sloj rožnjače odgovoran za 99% otpora za difuziju lekovitih supstanci, dok ostali slojevi (stroma i endotelni sloj) mogu delimično uticati na difuziju izrazito lipofilnih jedinjenja [120, 121], zaključuje se da PAMPA predstavlja korisnu tehniku predviđanja kornealne permeabilnosti za lekovite supstance za koje hidrofilna stroma neće biti ograničavajući faktor permeabilnosti. Ova metoda podrazumeva ispitivanje permeabilnosti supstance mehanizmom pasivne difuzije iz donorskog u akceptorski odeljak kroz veštačku membranu. Ispitivanje se sprovodi na mikrofilterskim pločama (96 bunarića) koje imaju donorski i akceptorski odeljak između kojih se postavlja veštačka membrana formirana od fosfolipida. Nakon inkubacije, meri se sadržaj lekovite supstance u svakom odeljku primenom odgovarajuće analitičke metode, na osnovu čega se određuje permeabilnost [107].

In vivo ispitivanja oftalmoloških preparata se pored određivanja biološke raspoloživosti i bioekvivalencije, praćenjem koncentracije primenjene lekovite supstance u suznoj tečnosti, izvode radi procene okularne podnošljivosti (*Draize* test), odnosno bezbednosti. Za *in vivo* ispitivanja oftalmoloških preparata, u najvećem broju studija, kao eksperimentalne životinje, koriste se zečevi, ali i druge životinjske vrste, npr. psi [122]. *Draize*-ov test je test akutne toksičnosti osmišljen 1944.

godine od strane FDA-a i toksikologa John H. Draize i Jacob M. Spines. Prilikom izvođenja testa, prati se eventualna pojava crvenila, otoka, suzenja, ulceracija, krvarenja, zamagljenja vida ili slepila na oku zečeva. Nakon testa, životinje se podvrgavaju eutanaziji, ako je došlo do nepovratnog oštećenja oka. Životinje se mogu ponovo koristiti za testiranje, ako preparat koji je testiran nije izazvao nikakva trajna oštećenja [123].

Zbog kontroverzne prirode, primena *Draize* testa u SAD-u i Evropi smanjena je poslednjih godina i ponekada je modifikovana primenom anestetika i niže koncentracije ispitivanih supstanci. Supstance za koje se već u *in vitro* uslovima utvrdi pojava neželjenih efekata, ne koriste se pri izvođenju *Draize* testa, što dovodi do smanjenja broja testova [123]. Pri planiranju eksperimentalnog rada na životinjama, potrebno je poštovati etičke principe. Prema Direktivi 2010/63/EU Evropskog Parlamenta prilikom izbora metoda ispitivanja, principi zamene, smanjenja i usavršavanja (engl. *Replacement, Reduction and Refinement*) treba da se primenjuju kroz strogu hijerarhiju zahteva sa ciljem korišćenja alternativnih metoda. Gde god je moguće, umesto eksperimenta *in vivo* neophodno je koristiti alternativne eksperimentalne *in vitro* modele (npr. ćelijske kulture, izolovani organi, mikroorganizme) i kompjuterske simulacije. Zahtev za smanjenje upotrebe eksperimentalnih životinja odnosi se pre svega na toksikološka ispitivanja. Tamo gde zakonodavstvo Evropske unije ne priznaje ni jednu alternativnu metodu, potrebno je koristiti najmanji mogući broj eksperimentalnih životinja pridržavajući se statističkih procena. Neophodno je osigurati korišćenje zdravih životinja, životinja odgovarajuće vrste i uzrasta koje moraju biti propisno uzgojene i čuvane i po mogućnosti srodne [124].

Epitel rožnjače predstavlja najosetljiviju i prvu površinu oka sa kojom u kontakt dolaze supstance koje potencijalno mogu izazvati iritaciju. Rožnjača je veoma osetljiva na nespecifične iritanse poput pH vrednosti i toničnosti (hipo- i hiper-) oftalmoloških preparata [15]. Ovaj spoljašnji sloj rožnjače štiti ostatak tkiva ograničavajući penetraciju stranih supstanci, dok istovremeno omogućava prolazak kiseonika i nutrijenata ka dubljim slojevima rožnjače. Procena biokompatibilnosti i citotoksičnosti predstavlja jedan od osnovnih činilaca koje je potrebno razmotriti prilikom razvoja novih formulacija oftalmoloških preparata [122].

In vitro uzgojene kulture humanih ćelija epitela rožnjače i test redukcije tetrazolijumove soli (MTT) predstavljaju korisnu tehniku za sprovođenje preliminarnih studija citotoksičnosti novih oftalmoloških formulacija. 3D modeli humanih ćelija rožnjače predloženi su kao korisna alternative klasičnom *Draize* testu u cilju procene potencijalnih iritirajućih efekata na oko, nakon primene farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda [125]. Pokazalo se da MTT test predstavlja brzu i isplativu metodu skrininga citotoksičnosti novih lekovitih preparata, a postupak koji se sprovodi na 3D modelima rožnjače pruža dobru korelaciju između *in vitro* rezultata i vrednosti modifikovanog maksimalnog prosečnog rezultata (engl. *Modified Maximum Average Score, MMAS*) koje odgovaraju maksimalnom prosečnom rezultatu (engl. *Maximum Average Score, MAC*), dobijenom nakon 24 h ili više u *in vivo* eksperimentu. Korišćenje besmrtnih ćelijskih linija je izuzetno prihvatljivo sa aspekta dostupnosti, ponovljivosti, lakoće održavanja i lakoće otkrivanja oštećenja [122, 125].

U cilju procene patofizioloških aspekata i praćenja efikasnosti oftalmoloških preparata koji sadrže antihistaminike, razvijeni su različiti animalni modeli alergijskog konjunktivitisa. *In vivo* studije podrazumevaju primenu izazivača alergijskih reakcija (pruritogena) eksperimentalnoj životinji, što dovodi do karakterističnog ponašanja koje se može kvantifikovati [126, 127, 128].

Svrab je karakterističan simptom kod različitih formi konjunktivitisa, a koji se kod animalnih subjekata manifestuje u formi karakterističnog češanja oka zadnjom šapom. Češanje oka može dovesti do oštećenja površine oka što prouzrokuje dodatnu inflamaciju i pojačavanje osećaja svraba. Kao posledica narušavanja integriteta rožnjače koja je izuzetno osetljiva na algogene podražaje, moguća je pojava bola. Zbog toga je značajno efikasno suzbiti osećaj svraba, kako bi se sprečio nastanak dodatnih oštećenja i pojave osećaja bola [129]. Kao animalni subjekti u pretkliničkim modelima alergijskog konjunktivitisa najčešće su korišćeni glodari, zamorci [130, 131] i miševi [132, 133]. Miševi soja C57BL/6 preporučuju se kao najpodesniji animalni subjekt za postavljanje modela alergijskog konjunktivitisa i ispitivanje potencijalno novih tretmana [129, 134].

2.CILJ RADA

Cilj eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije je razvoj novih, biokompatibilnih, viskoznih vehikuluma za kapi za oči baziranih na polisahardinim polimerima (derivati celuloze, hidrokispropil guar guma, hitozan i natrijum-hijaluronat) sa lubrikantnim svojstvima i poboljšanim mukoadhezivnim karakteristikama, te preporučenim osobinama ključnim za kvalitet oftalmoloških preparata koje se planiraju postići variranjem vrste, koncentracija i kombinacija polimera. Očekuje se da bi novoformulisani vehikulumi mogli imati koristan efekat u ublažavanju simptoma sindroma suvog oka, produženo vreme zadržavanja na mestu primene i efikasno odupiranje drenažnom sistemu. Pored toga, očekuje se da će razvijeni vehikulumi, kao nosači za lekovite supstance iz grupe antihistaminika (ketotifena i olopatadina), unaprediti njihovu okularnu raspoloživost. Postavljeni cilj realizovan je kroz tri faze eksperimentalnog rada.

Cilj prve faze eksperimentalnog rada bio je razvoj viskoznih vehikuluma koji sadrže jedan ili kombinaciju polisaharidnih polimera u odgovarajućim koncentracijama koji će uz dodatak ostalih pomoćnih supstanci koje uobičajeno ulaze u sastav oftalmoloških preparata (sredstva za izotonizaciju, pufera, konzervansa i sredstava za podešavanje pH vrednosti), posedovati optimalne fizičko-hemijske i funkcionalne karakteristike relevantne za njihovu primenu kao lubrikanasa i vehikuluma za kapi za oči.

Cilj druge faze eksperimentalnog rada bila je izrada kapi za oči sa model lekovitim supstancama (ketotifen i olopatadin) i vehikulumima koji su na osnovu optimalnih karakteristika odabrani po završetku prve faze eksperimentalnog rada. Karakterizacija izrađenih kapi za oči obuhvatila je ispitivanje kompatibilnosti lekovitih i pomoćnih supstanci, procenu kornealne permeabilnosti model lekovitih supstanci primenom različitih *in vitro* (ćelijskih i bezćelijskih) modela rožnjače, kao i procenu preliminarne stabilnosti izrađenih kapi za oči sprovođenjem ubrzanih testova („stres“ studija). U ovoj fazi istraživanja u cilju procene postignutih unapređenja različitim formulacionim pristupima, dobijeni rezultati su poređeni sa komercijalno dostupnim kapima za oči sa istim lekovitim supstancama, koji u sastavu ne sadrže polimere ili druge supstance za povećanje viskoziteta.

Cilj treće faze eksperimentalnog rada bio je utvrđivanje biokompatibilnosti i efikasnosti izrađenih formulacija kapi za oči. Biokompatibilnost je procenjena na dva različita *in vitro* HCE-T ćelijska modela i sprovođenjem MTT testa, dok je procena efikasnosti u suzbijanju osećaja svraba i bola ispitivana na oku miševa (soj C57BL/6) u modelu akutnog alergijskog konjunktivitisa. Kao referentni uzorci i u ovoj fazi istraživanja, radi poređenja dobijenih rezultata, korišćeni su komercijalno dostupni preparati kapi za oči sa istim lekovitim supstancama.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 MATERIJALI

Za izradu vehikuluma sa lubrikantnim svojstvima korišćeni su polimeri čije osobine su navedene u tabeli 3.1.

Kao polisaharidni polimeri korišćeni su: hipromeloza (HPMC) (Fagron, Belgija), hidroksietilceluloza (HEC) (Acef, Italija), hitozan, niske i srednje molekulske mase, visokog stepena deacetilacije (> 75%) (LMW i MMW CS) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka), hidroksipropil guar guma (HP 40 GG) (MS = 0,4) (Ashland Inc., SAD), hidroksipropil guar guma (HP GG) (MS = 0,6) (Solvay Chemicals GmbH, Nemačka) i natrijum-hijaluronat (NH) (Sandream Impact, LLC, SAD).

Kao sredstvo za izotonizaciju korišćen je natrijum-hlorid (Lach-Ner, Češka), a kao puferska komponenta natrijum-hidrogenfosfat, bezvodni (Lach-Ner, Češka). Za konzervisanje upotrebljavan je benzalkonijum-hlorid (BAK) (Fagron, Belgija). Prilikom procene mukoadhezivnih karakteristika ispitivanih vehikuluma, korišćen je mucin dobijen iz svinjskog želuca (tip II) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka).

Model lekovite supstance su bile olopatadin-hidrohlorid (OLO) (Shanghai Pengteng Fine Chemical, Šangaj, Kina) i ketotifen-hidrogenfumarat (KF) (Beijing Mesochem Technology, Peking, Kina).

U cilju ispitivanja permeabilnosti model lekovitih supstanci kroz *in vitro* uzgojenu humanu rožnjaču korišćena je besmrtna ćelijska linija epitela rožnjače (HCE-T; RIKEN Cell Bank, Japan). *In vitro* ćelijski modeli (I i II) uzgojeni su na polikarbonatnim pločama Transwell® (promera 12 mm, površine 1,12 cm², veličine pora 0,4 μm (I) i 3,0 μm (II); Corning B.V. Life Sciences, Holandija), dok je za oblaganje ploča korišćen humani fibronektin (I), odnosno kolagen iz repa pacova tip I (II) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka). Uzgoj ćelija vršen je uz dodatak medijuma za uzgoj i ishranu ćelija Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/ F-12) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka) koji sadrži fetalni goveđi serum (5%, Biosera, Francuska), humani insulin (5 μg/ml, Applichem, Nemačka), dimetilsulfoksid (0,5%, Applichem), epidermalni faktor rasta (10 ng/ml, Applichem, Nemačka) i Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B (Lonza, Švajcarska). Henkov balansirani rastvor elektrolita (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) (pH 5,5) pripremljen je rastvaranjem natrijum-hlorida (8,0 mg/ml) (Kemig, Hrvatska), kalijum-hlorida (0,4 mg/ml) (Kemig, Hrvatska), natrijum-hidrogenkarbonata (0,35 mg/ml) (Kemig, Hrvatska), D-glukoza, monohidrata (1,1 mg/ml) (Kemig, Hrvatska), kalijum-dihidrogenfosfata (0,06 mg/ml) (Kemika, Hrvatska), natrijum-hidrogenfosfat, dihidrata (0,06 mg/ml) (Fluka Chemie AG, Švajcarska), magnezijum-hlorid, heksahidrata (0,1 mg/ml) (Merck, Nemačka), magnezijum-sulfat, heptahidrata (0,1 mg/ml) (Kemig, Hrvatska), kalcijum-hlorid, dihidrata (0,185 mg/ml) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka) i HEPES (4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina) (7,15 mg/ml) (Applichem, Nemačka).

Za izvođenje PAMPA testa korišćen je L- α -fosfatidilholin (lecitina jajeta (> 99%)) (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka). Za ispitivanje biokompatibilnosti korišćen je MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid) (Applichem, Nemačka).

U *in vivo* studiji, za izazivanje osećaja svraba na oku miševa, korišćen je histamin-dihlorid (Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Nemačka).

Za izradu svih uzoraka i u toku ispitivanja korišćena je sveže dobijena prečišćena voda (GenPure apparatus, TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Nemačka).

Svi upotrebljeni reagensi i hemikalije odgovaraju zahtevima važećih farmakopeja (Ph. Eur., USP).

Tabela 3.1. Osobine polimera korišćenih za formulaciju viskoznih vehikuluma za kapi za oči [27, 43]

Naziv polimera	Hidroksietilceluloza	Hipromeloza	Hitozan (niskomolekulski/ srednjemolekulski)	Natrijum-hijaluronat	Hidroksipropil guma	guar
Definicija	parcijalno <i>O</i> -(2- hidroksietil) celuloza	parcijano <i>O</i> -metil i (2- hidroksipropil) celuloza	2-amino-2-deoksi-(1,4)- β -D-glukopiranan	natrijum-hijaluronat	guar guma, 2- hidroksipropil etar	
CAS broj	9004-62-0	9004-65-3	9012-76-4	9067-32-7	39421-75-5	
Osobine	Nejonski polimer; u hladnoj vodi obrazuje viskozne koloidne rastvore; kompatibilan sa velikim brojem lekovitih supstanci i stabilan pri autoklaviranju	Nejonski polimer; u hladnoj vodi obrazuje viskozne koloidne rastvore; kompatibilan sa velikim brojem lekovitih supstanci i stabilan pri autoklaviranju	Katjonski polimer; obrazuje bistre rastvore ili gelove u kombinaciji sa polianjonskim polimerima; rastvori poseduju pseudoplastična i viskoelastična svojstva	Visoko molekulski polianjonski linearni mukopolisaharid; sastoji se od naizmenično poredanih jedinica N- acetilglukozamina i D- glukuronske kiseline	Visokomolekulski oblik, nejonski polimer za povećanje viskoziteta, efikasan u niskim koncentracijama, daje bistre rastvore; kompatibilan sa katjonskim surfaktantima i elektrolitima	
Rastvorljivost u vodi	Rastvorljiv u vrućoj i hladnoj vodi pri čemu nastaje kolodni rastvor	Rastvara se u hladnoj vodi, pri čemu nastaje koloidni rastvor	Umereno rastvorljiv u vodi	Umereno rastvorljiv ili rastvorljiv u vodi	U hladnoj ili vrućoj vodi odmah nabubri i daje viskoznan rastvor	
Izgled	Beo, žućkastobeo ili sivkastobeo prašak ili granule	Beo, žućkastobeo ili sivkastobeo prašak ili granule, higroskopian nakon sušenja	Beo ili gotovo beo, fini prašak	Beo ili gotovo beo higroskopian prašak ili fibrozni agregati	Gotovo beo do svetlo žut prašak	
Viskozitet (mPa·s)	4500–6500	~4000	20–300 / 200–800	/	2500–4500 (1%) (2 h)	

3.2 METODE

3.2.1 Prva faza eksperimentalnog rada

U prvoj fazi eksperimentalnog rada pripremljeni su vehikulumi koji sadrže pojedinačne polimere u rasponu koncentracija 0,25%–1,5%, u zavisnosti od upotrebljenog polimera i postojećih literaturnih podataka, kako bi se procenio njihov uticaj na viskozitet, te tako odabrale i odgovarajuće koncentracije polimera koje su kombinovane u izradi vehikuluma. U ovoj fazi izvršeno je merenje molekulske mase polimera za koje nisu bili dostupni tačni podaci u literaturi i sertifikatima analize (MMW CS i dva uzorka HP GG), s obzirom da vrednosti navedenog parametra mogu značajno uticati na njihove funkcionalne karakteristike.

Nakon fizičko-hemijske karakterizacije izrađenih vehikuluma izvršena je selekcija onih koji poseduju preporučene karakteristike za oftalmološke preparate u pogledu izgleda i bistrine, osmolalnosti, površinskog napona, viskoziteta, kao i tipa proticanja pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima. Izvršeno je ispitivanje preliminarnosti stabilnosti izrađenih vehikuluma nakon čuvanja 28 dana pri ambijentalnim uslovima (uobičajen rok upotrebe za oftalmološke preparate nakon otvaranja), a po isteku definisanog perioda ponovljena su ispitivanja izgleda, bistrine, pH i viskoziteta.

Dodatno, izvršena je procena mukoadhezivnih karakteristika odabranih vehikuluma kako onih sa pojedinačnim, tako i onih sa kombinacijom dva polimera. S obzirom da su u ovoj fazi vehikulumi posmatrani kao potencijalni lubrikansi koji bi se mogli koristiti u tretmanu sindroma suvog oka, ispitivanja funkcionalnih karakteristika su istovremeno vršena i na komercijalno dostupnim preparatima iz grupe preparata za vlaženje i negu oka.

3.2.1.1 Izrada vehikuluma sa lubrikantnim svojstvima

Svi vehikulumi su izrađeni u laboratorijskim uslovima, na sobnoj temperaturi, uz korišćenje sveže dobijene prečišćene vode, a potom su sterilisani primenom zasićene vodene pare pod pritiskom na 121 °C tokom 15 minuta (Autoklav serija 250, Sutjeska, Srbija). Sastav vehikuluma prikazan je u tabeli 3.2.

Na početku izrade pripremljeni su osnovni rastvori polimera čija koncentracija je bila dvostruko veća nego u finalnom vehikulumu. Osnovni rastvori HP GG i NH pripremljeni su dispergovanjem odgovarajuće količine polimera u sveže prečišćenoj vodi (~75% od ukupne količine vehikuluma) uz mešanje na magnetnoj mešalici (Falc, Italija) u toku 1–2 h. Nakon toga, rastvori polimera su čuvani u frižideru u toku 24 h, na temperaturi 2–8 °C radi potpune hidratacije polimera. Osnovni rastvor hitozana pripreman je na isti način, ali u 1% - tnom (V/V) rastvoru sirćetne kiseline. Osnovni rastvori derivata celuloze pripremljeni su tako što su odgovarajuće količine polimera posute po površini dela prečišćene vode (~60%) potrebne za izradu rastvora, zagrejane na temperaturu od 80–90 °C, i ostavljeni da hidratišu u toku 2–3 h. Nakon hidratacije polimera, rastvori su dopunjeni do propisanog volumena prečišćenom vodom, ohlađenom na 0 °C uz dodatno mešanje na magnetnoj mešalici u narednih 15 minuta do dobijanja bistrog rastvora.

U delu prečišćene vode (~20% od ukupne količine vehikuluma) rastvorene su odgovarajuće količine pomoćnih supstanci, natrijum-hlorid kao sredstvo za izotonizaciju, dibazni natrijum-fosfat kao puferska komponenta uz mešanje na ultrazvučnom kupatilu (Bandelin electronic, DT ×2 H, Nemačka) do potpunog rastvaranja. Nakon potpunog hidratisanja, prethodno pripremljenim rastvorima polimera dodat je rastvor pomoćnih supstanci i izvršeno konzervisanje vehikuluma uz dodavanje odgovarajuće količine 1% - tnog rastvora BAK. Dodavanjem odgovarajuće količine rastvora 1M hlorovodonične kiseline ili 1M natrijum-hidroksida izvršeno je podešavanje pH vrednosti vehikuluma do odgovarajućih vrednosti (tabela 3.2). Vehikulumi su dopunjeni prečišćenom vodom do propisanog volumena.

Tabela 3.2. Sastav ispitivanih vehikuluma za kapi za oči

Sastav	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14
	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)
HPMC	1,0	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEC	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
LMW CS	-	-	1,0	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMW CS	-	-	-	-	1,0	0,5	-	-	-	-	-	0,5	-	-
HP 40 GG	-	-	-	-	-	-	0,25	0,5	1,0	1,5	0,25	0,25	-	0,25
NH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4
Natrijum-hlorid	0,6	0,6	0,5	0,5	0,2	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,7	0,7
BAK	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Dibazni natrijum-fosfat (anhidrovani)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ciljna pH (HCl/NaOH)	6,0–7,8	6,0–7,8	5,5–6,0	5,5–6,0	5,5–6,0	5,5–6,0	6,4–7,9	6,4–7,9	6,4–7,9	6,4–7,9	6,4–7,9	5,5–6,0	6,4–7,9	6,4–7,9
Prečišćena voda	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml

3.2.1.2 Izgled i bistrina

Izgled je ispitivan organoleptički u skladu sa zahtevima testa *Bistrina i stepen opalescencije tečnosti* prema Ph. Eur. 10.0 (2.2.1) [43].

3.2.1.3 Merenje pH vrednosti

Merenje pH vrednosti svih vehikuluma vršeno je u toku izrade, 24 h nakon izrade, kao i tokom praćenja stabilnosti primenom potenciometrijske metode prema Ph. Eur. 10.0 (2.2.3) [43] direktnim uranjanjem elektrode pH metra HI 9321 (Hanna Instruments Inc., SAD) u vehikulum na temperaturi 22 ± 2 °C. Pre merenja izvršena je kalibracija uređaja standardnim rastvorima pufera pH 4,0 i pH 7,0.

3.2.1.4 Merenje osmolalnosti

Osmolalnost ispitivanih vehikuluma merena je metodom koja se bazira na sniženju tačke mržnjenja prema Ph. Eur. 10.0 (2.2.35) [43] korišćenjem osmometra Model 3320 (Advanced Instruments, Inc., Mass., SAD). Uređaj je pre upotrebe kalibrisan primenom standardnih rastvora 50 mOsm/kg i 800 mOsm/kg.

3.2.1.5 Određivanje molekulske mase polimera

Molekulska masa polimera (CS, HP 40 GG i HP GG) određena je primenom Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija). Određivanje molekulske mase rastvora polimera bazira se na zavisnosti prosečnog intenziteta rasute svetlosti od koncentracije rastvora, pri čemu se koristi pet različitih koncentracija rastvora (0,001 g/ml, 0,0005 g/ml, 0,00025 g/ml, 0,000125 g/mL i 0,0000625 g/ml). Merenja su vršena na temperaturi od 25 °C. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem DTS (v4.2) softvera (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Velika Britanija).

Tabela 3.3. Sastav registrovanih preparata koji su korišćeni u okviru eksperimentalnog dela [78, 135-137]

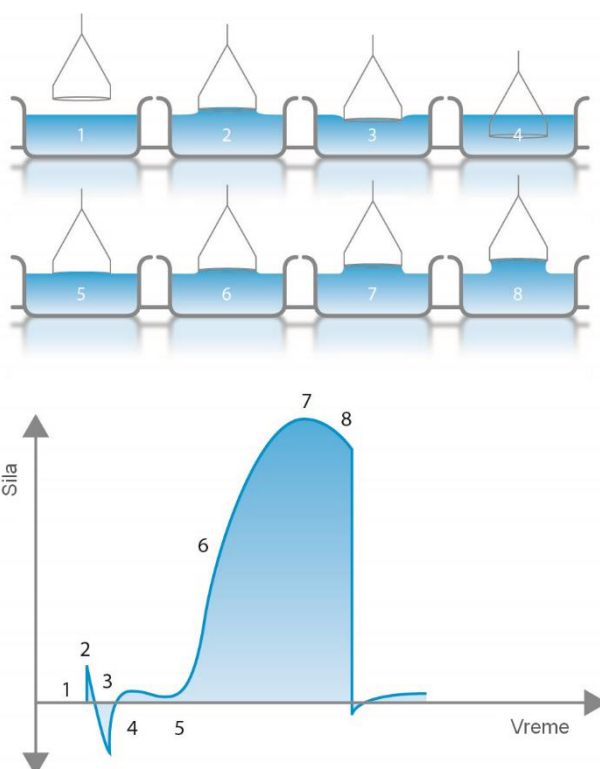
Naziv preparata	Hemodrops® (HD)	Systane® Ultra Lubricant (SU)	Systane® Gel Drops (SGD)	Proculin® Tears (Pro)	Hipromeloza, kapi za oči 0,3% (VS) ¹
Proizvođač/Zemlja	Hemomont d.o.o, Crna Gora	Alcon Laboratories, Inc., SAD	Alcon Laboratories, Inc., SAD	Alkaloid AD, Severna Makedonija	Srbija
Kategorija	Lek	Medicinsko sredstvo	Medicinsko sredstvo	Medicinsko sredstvo	Galenski lek
Lekovita/Aktivna supstanca	hipromeloza (0,5%)	polietilenglikol 400 (0,4%) propilenglikol (0,3%)	polietilenglikol 400 (0,4%) propilenglikol (0,3%)	natrijum-hijaluronat (0,2%)	hipromeloza (0,3%)
Pomoćne supstance	natrijum-hlorid	aminometilpropanol	aminometilpropanol	dvobazni natrijum-fosfat	natrijum-hlorid
	kalijum-hlorid	borna kiselina	borna kiselina	monobazni natrijum-fosfat	kalijum-hlorid
	borna kiselina	hidroksipropil guar	hidroksipropil guar	natrijum-hlorid	borna kiselina
	boraks	polyquad® (polyquaternium-1) 0,001% konzervans	polyquad® (polyquaternium-1) 0,001% konzervans	natrijum-edetat	boraks
	BAK 0,01% konzervans	kalijum-hlorid	kalijum-hlorid	BAK 0,01% konzervans	BAK 0,01% konzervans
	voda za injekcije	natrijum-hlorid	natrijum-hlorid	voda za injekcije	voda za injekcije
		sorbitol	sorbitol		
		prečišćena voda	dinatrijum-edetat		
			prečišćena voda		

¹ Izrađen prema propisu MF 2008 (*Hypromellosi oculoguttæ 0,3%*) [138]

3.2.1.6 Tenziometrijsko merenje površinskog napona

Merenje površinskog napona uzoraka izvedeno je korišćenjem tenziometra Sigma 703D (KSV Instruments, Finska), metodom otkidanja prstena (engl. *Du Noüy method*) (slika 3.1). Merenja su rađena u laboratorijskim čašama od 50 ml, tako što je u čašu sipano 20 ml uzorka, nakon čega je ona postavljena u oblogu za termostatiranje i u nju uronjen prsten (pri temperaturi od 25 °C), nekoliko milimetara ispod površine. Uzorak je ostavljen 30 minuta radi stabilizacije adsorpcionog sloja. Postupak merenja se sastoji u izvlačenju prstena iz rastvora, bez raskidanja adsorpcionog sloja i očitavanju maksimalne vrednosti površinskog napona.

Površinski napon meren je kod odabranih uzoraka sa i bez konzervansa, kako bi se procenio njegov uticaj na vrednost ovog parametra. Prikazane vrednosti površinskog napona predstavljaju srednje vrednosti najmanje tri merenja.



Slika 3.1. Šematski prikaz određivanja površinskog napona metodom otkidanja prstena (engl. *Du Noüy method*) (prilagođeno iz [139])

3.2.1.7 Reološka karakterizacija

Reološka karakterizacija je izvršena primenom rotacionog reometra Rheolab MC 120 (Paar Physica, Nemačka) uz upotrebu mernog sistema koaksijalnog cilindra Z3 DIN (25 mm), sprovođenjem kontinualnih (rotacionih) i oscilatornih (dinamičkih) merenja.

Kontinualna reološka merenja podrazumevala su primenu CSR (engl. *controlled shear rate*) merne procedure pri kojoj se vrši kontinuirana promena brzine smicanja u dva merna opsega ($0-100 \text{ s}^{-1}$ i $100-0 \text{ s}^{-1}$). Merenja su vršena 24 h nakon pripreme vehikuluma i tokom praćenja stabilnosti. Temperature merenja su bile 20 °C i 34 °C (temperatura površine oka). Kako bi se simulirali fiziološki uslovi, uzorci su mešani sa veštačkom suznom tečnošću (engl. *simulated tear fluid*) (tabela 3.4), čija pH vrednost je podešena na 7,4. Ispitivani uzorak i veštačka suzna tečnost su pre merenja pomešani u odnosu 40:7 i termostatirani u toku 15 minuta na temperaturi od 34 °C. Na osnovu dobijenih podataka konstruisane su krive zavisnosti viskoziteta (η) od brzine smicanja (γ). Uporedna ispitivanja vršena su na komercijalno dostupnim lubrikansima (tabela 3.3). Za svaki uzorak merenja su sprovedena u triplikatu i dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost \pm standardna devijacija (SD).

Oscilatorna reološka analiza sprovedena je sa ciljem određivanja tipa interakcija između korišćenih polimera i mucina. Smeša vehikuluma i mucina pripremana je u odnosu 1:1 mešanjem jednakih količina vehikuluma koji su sadržavali dvostruko veće koncentracije polimera i ostalih pomoćnih materija od onih prikazanih u tabeli 3.2 i disperzije mucina (20%, m/m), tako da je koncentracija polimera u smeši bila jednaka koncentraciji polimera u vehikulumu, a koncentracija mucina u smeši bila je 10% (m/m). U cilju utvrđivanja linearnog viskoelastičnog regiona, primenjena je merna procedura dinamičke promene napona smicanja (engl. *dynamic stress sweep*) pri konstantnoj frekvenciji od 1 Hz i naponu smicanja u opsegu od 0,1 do 10 Pa. Nakon određivanja viskoelastičnog regiona primenjena je merna procedura praćenja parametara oscilatorne reologije: elastičnog modula (G'), viskoznog modula (G'') i tangensa faznog ugla ($\tan \delta$) pri opsegu frekvencija 0,1–10 Hz (engl. *frequency sweep*), pri konstantom naponu smicanja.

Tabela 3.4. Sastav veštačke suzne tečnosti (VST)

Sastav	% (m/V)
Natrijum-hlorid	0,670
Natrijum-bikarbonat	0,200
Kalcijum-hlorid, dihidrat	0,008
Prečišćena voda	q.s. do 100 ml

3.2.1.8 Preliminarno ispitivanje stabilnosti vehikuluma nakon sterilizacije parom i perioda čuvanja od 28 dana

Pripremljeni vehikulumi spakovani u staklene bočice, visoke hidrolitičke otpornosti (tip I), zatvorene gumenim čepom preko kojeg je stavljena aluminijumska kapica i podvrgnuti su sterilizaciji parom u autoklavu (temperatura 121 °C i pritisak 101,3 kPa) u trajanju od 15 minuta. Nakon sterilizacije izvršeno je ispitivanje izgleda i bistrine (3.2.1.2) i merenje pH vrednosti i viskoziteta kako bi se uočile eventualne promene u strukturi i funkcionalnim karakteristikama polimera u sastavu vehikuluma pod uticajem uslova sterilizacije. Nakon sterilizacije, vehikulumi su čuvani 28 dana pri ambijentalnim uslovima (uobičajen rok upotrebe za oftalmološke preparate nakon otvaranja), te su po isteku definisanog perioda ponovljena navedena ispitivanja.

3.2.1.9 Statistička analiza

Statistička analiza dobijenih rezultata u toku reološke karakterizacije, ispitivanja uticaja procesa sterilizacije na stabilnost vehikuluma i funkcionalne osobine polimera, sprovedena je korišćenjem programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD; www.graphpad.com). Tokom statističke analize korišćen je ANOVA test uz dopunu multiparametarskim Tukey's post-hoc testom (granica statističke značajnosti $p < 0,05$).

3.2.1.10 Ispitivanje mukoadhezivnih karakteristika primenom *in vitro* metoda

U cilju procene mukoadhezivnih svojstava izrađenih vehikuluma korišćene su tri *in vitro* metode: turbidimetrijska, metoda koja se zasniva na promeni zeta potencijala i reološka metoda. Turbidimetrijska metoda koja se zasniva na merenju turbiditeta disperzije mucina nakon inkubacije sa ispitivanim uzorkom. Nakon mešanja rastvora polimera sa disperzijom mucina, u slučaju interakcije, dolazi do pojave precipitata i promene turbiditeta u odnosu na turbiditet disperzije mucina [103].

Pripremljena je sveža disperzija mucina koncentracije 0,1% (m/V) u vehikulumu za kapi za oči (bez polimera) i mešanje je vršeno na ultrazvučnom kupatilu dok nije došlo do formiranja homogene disperzije bez aglomerata (oko 30 minuta). Napravljene su smeše ispitivanih vehikuluma i sveže pripremljene disperzije mucina u odnosu 1:1. U ispitivanje je bila uključena i sama disperzija

mucina (0,1%, m/V) radi poređenja turbiditeta. Svi uzorci su postavljeni u rotirajuće vodeno kupatilo (LSB Aqua Pro, LLG international GmbH, Nemačka) prethodno zagrejano na temperaturu od 34 °C koja je održavana tokom eksperimenta. Turbiditet smeše uzorka i disperzije mucina meren je pomoću UV-VIS spektrofotometra (Shimadzu UV – 1800, Japan) na 650 nm (talasna dužina vidljive svetlosti) svakih sat vremena (6-8 h) uključujući i merenje neposredno nakon mešanja jednakih količina uzorka i mucina, te je izvršeno poređenje sa turbiditetom disperzije mucina. Zapremina uzorka bila je 2,5 ml (zapremina kivete), bez nadoknade medijuma u toku ispitivanja. Kao slepa proba korišćena je prečišćena voda.

Moguće elektrostatičke interakcije između polimera unutar vehikuluma i mucina procenjene su i na osnovu promena zeta potencijala smeše vehikuluma i disperzije mucina (u odnosu 1:1) u odnosu na zeta potencijal samog vehikuluma [140]. Merenja su izvedena na 34 °C korišćenjem uređaja Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija).

Dodatna analiza mukoadhezivnih svojstava onih vehikuluma koji su primenom prethodne dve metode pokazali postojanje potencijalnih interakcija između polimera i mucina, izvršena je primenom viskozimetrijske metode.

Viskozitet je meren na temperaturi od 34 °C, kao što je opisano (3.2.1.7), u sledećim uzorcima:

- uzorak a) disperziji mucina 10% (m/m)
- uzorak b) vehikulumu (sastav naveden u tabeli 3.2)
- uzorak c) smeši disperzije mucina 10% (m/m) i vehikuluma (koncentracija polimera kao u uzorku b).

Smeše su pripremljene tako što su u jednakim količinama pomešane sveže pripremljena disperzija mucina u prečišćenoj vodi, koncentracije 20% (m/m) i vehikuluma koji je sadržavao dvostruko veće koncentracije polimera i ostalih pomoćnih supstanci u odnosu na sastav naveden u tabeli 3.2. Disperzija mucina je pripremljena tako što je u jednom delu prečišćene vode dispergovana odgovarajuća količina svinjskog mucina uz mešanje na magnetnoj mješalici (Falc, Italija) brzinom 300 o/min u toku 24 h. Nakon toga je uz dodatak 1M hlorovodonične kiseline izvršeno podešavanje pH vrednosti do 3,5, i disperzija dopunjena prečišćenom vodom do propisane mase.

Nakon merenja viskoziteta, izvršeno je izračunavanje parametra „reološkog sinergizma“ (sin. mukoadhezivni indeks) ($\Delta\eta$) pri 25, 50, 75 i 100 s⁻¹ za svaku smešu vehikulum-mucin, na osnovu jednačine (prema [105]):

$$\Delta\eta = \eta_{\text{smeša}} - (\eta_{\text{vehikulum}} + \eta_{\text{mucin}})$$

Jednačina 3.1

gde je $\eta_{\text{smeša}}$ prividni viskozitet (mPa·s) smeše vehikuluma i disperzije mucina (uzorak c), $\eta_{\text{vehikulum}}$ prividni viskozitet vehikuluma (uzorak b) i η_{mucin} prividni viskozitet disperzije mucina (uzorak a).

Kako bi se mogla uporediti mukoadheziva svojstva vehikuluma koji u svom sastavu imaju polimere različitih funkcionalnih karakteristika, odnosno kako bi se eliminisao uticaj viskoziteta različitih polimera, izračunat je i parametar „normalizovanog reološkog sinergizma“ (sin. normalizovani mukoadhezivni indeks) deljenjem dobijene vrednosti $\Delta\eta$ sa prividnim viskozitetom ispitivanih vehikuluma [141].

3.2.2 Druga faza eksperimentalnog rada

Druga faza eksperimentalnog rada obuhvatala je izradu kapi za oči sa model lekovitim supstancama (OLO i KF) i vehikulumima koji su odabrani na osnovu dobijenih rezultata u okviru prve faze eksperimentalnog rada.

Vehikulumi su odabrani na osnovu optimalnih fizičko-hemijskih, reoloških i mukoadhezivnih karakteristika. Na početku druge faze izvršena je evaluacija mogućih interakcija između polimera koji su kombinovani tokom izrade vehikuluma, kao i polimera i lekovitih supstanci primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom/ FTIR spektroskopije. Sprovedena je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija

kapi za oči sa model lekovitim supstancama koja je uključila ispitivanja izgleda i bistrine, pH vrednosti, osmolalnosti i viskoziteta ranije opisanim metodama, ali i merenje površinskog napona i kontaktnog ugla. Dodatno, određen je sadržaj model lekovitih supstanci korišćenjem metoda opisanih u odeljku 3.2.2.9.

U ovoj fazi izvršena je procena kornealne permeabilnosti model lekovitih supstanci primenom *in vitro* tehnika: humanih ćelijskih modela rožnjače (besmrtna ćelijska linija HCE-T ćelija) i testa permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA). U ispitivanje kornealne permeabilnosti istovremeno su bili uključeni komercijalno dostupni preparati kapi za oči sa istim lekovitim supstancama (tabela 3.5) kako bi se procenio uticaj upotrebljenih polimera na permeaciju lekovitih supstanci kroz modele rožnjače. Pored toga, izvršeno je ispitivanje preliminarne stabilnosti formulisanih kapi za oči u vremenskom periodu od godinu dana, a dodatno je sprovedena i studija stabilnosti ubrzanim testom (tzv. stres studija) stabilnosti.

Tabela 3.5 Sastav registrovanih preparata koji su korišćeni kao referentne formulacije u okviru eksperimentalnog dela [52, 78]

Naziv preparata	KFRef	Opatanol®
Proizvođač/Zemlja	*	Novartis Pharma Services AG, Švajcarska
Lekovita supstanca	ketotifen (0,25 mg/ml) u obliku hidrogenfumarata	olopatadin (1 mg/ml) u obliku hidrohlorida
	glicerol (2%)	BAK, konzervans
	natrijum-hidroksid 1M	natrijum-hlorid
Pomoćne supstance	voda za injekcije	dinatrijum-fosfat, dodekahidrat
		hlorovodonična kiselina i/ili natrijum- hidroksid
		prečišćena voda

*Referentna formulacija je sveže pripremljena na osnovu podataka navedenih u Sažetku karakteristika leka jer navedeni lek nije registrovan na tržištu Republike Srbije

3.2.2.1 Izrada kapi za oči sa model lekovitim supstancama

Kapi za oči sa model lekovitim supstancama pripremljene su na sobnoj temperaturi mešanjem sveže pripremljenog vehikuluma u čijem sastavu se nalaze odgovarajući polisaharidni polimeri i ostale pomoćne supstance i osnovnih (polaznih) rastvora OLO i KF.

Osnovni rastvor OLO (koncentracije 1% (m/V)), pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine supstance u sveže pripremljenoj prečišćenoj vodi. Osnovni rastvor KF (koncentracije 0,5% (m/V)), pripremljen je u sveže pripremljenoj prečišćenoj vodi kojoj je pH prethodno podešena na 3,5 pomoću 0,1M hlorovodonične kiseline, radi lakšeg rastvaranja. Osnovni rastvori su potom filtrirani kroz membranske filtre (0,22 µm) (Chromafil® Xtra PTFE-20/25, Macherey-Nagel, Nemačka).

Mešanje odgovarajućih količina vehikuluma i osnovnih rastvora lekovitih supstanci vršeno je na magnetnoj mešalici (Falc, Italija) u trajanju od 30 minuta. Finalne koncentracije model lekovitih supstanci u kapima za oči bile su 0,1% (m/V) – za OLO, odnosno 0,025% (m/V) za KF. Svi uzorci su čuvani 24 h pri ambijentalnim uslovima u dobro zatvorenim tamnim staklenim bočicama pre daljih ispitivanja. Nakon tog perioda, izvršeno je vizuelno posmatranje u cilju utvrđivanja pojave precipitata ili замуćenosti i određivanje sadržaja lekovitih supstanci odgovarajućim analitičkim postupcima (3.2.2.9).

3.2.2.2 Ispitivanje potencijalnih interakcija u smeši lekovite supstance i polimera

U cilju procene eventualno prisutnih intermolekulskih interakcija između lekovitih supstanci i upotrebljenih polisaharidnih polimera, analizirane su fizičke smeše lek-polimer i polimer-polimer u odnosu 1:1 primenom DSC i FTIR analize.

Za DSC analizu korišćen je uređaj Mettler Toledo DSC 1, opremljen STARE softverom (Mettler Toledo GmbH Analytical, Nemačka). Uzorci su postavljeni u standardne aluminijumske posude (40 μ l), a potom zagrevani na temperaturu od 25 do 350 $^{\circ}$ C sa brzinom grejanja od 10 $^{\circ}$ C/min u atmosferi azota, pri konstantnom protoku od 50 ml/min.

FTIR spektroskopska analiza sprovedena je primenom tehnike prigušene totalne refleksije (ATR) uz korišćenje FT-IR spektrofotometra (Thermo Scientific Nicolet iS10, Madison, WI, SAD) u oblasti 4000 - 400 cm^{-1} , pri rezoluciji 4 cm^{-1} .

3.2.2.3 Fizičko-hemijska karakterizacija kapi za oči sa OLO i KF

Karakterizacija izađenih kapi za oči sprovedena je praćenjem sledećih parametara: izgleda, pH vrednosti, osmolalnosti i viskoziteta, metodama koje su korišćene i za procenu vehikuluma, opisanim u prvoj fazi eksperimentalnog rada (3.2.1.2-3.2.1.4). Dodatno, bistrina je kontrolisana i primenom spektrofotometrijske metode (dvoznačni Shimadzu UV-VIS spektrofotometar, model 1800) određivanjem transparentije ispitivanih vehikuluma. Transparentija (T) predstavlja odnos količine svetlosti koja nije apsorbovana u vehikulum i ukupne količine svetlosti kojoj je vehikulum bio izložen, a izražava se u procentima. Merenje apsorbancije (A) se vrši na 480 nm, srednjoj talasnoj dužini ljudske percepcije svetlosti [43]. Optička transparentija ispitivanih formulacija izračunata je primenom formule:

$$A = 2 - \log_{10} \%T$$

Jednačina 3.2

3.2.2.4 Merenje površinskog napona i kontaktnog ugla

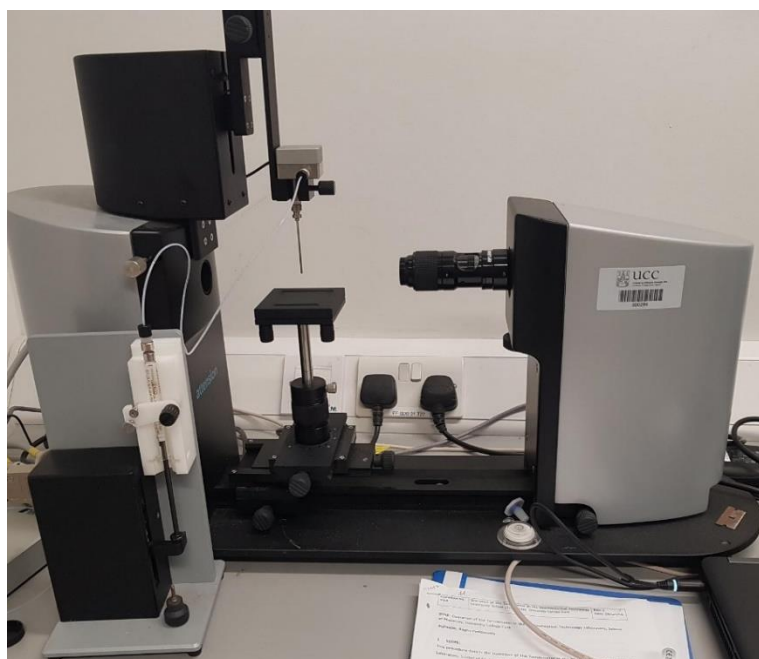
Površinski napon i kontaktni ugao kapi za oči sa lekovitim supstancama mereni su metodom kapi koja visi (engl. *pendent drop method*), odnosno metodom položene kapljice (engl. *sessile drop method*), pomoću Theta-Optical Tenziometra (Biolin Scientific, Švedska) (slika 3.2). Kap uzorka zapremine 10 μ l aplikovana je na ravnu površinu, a video slike su snimane tokom 10 sekundi (za površinski napon), odnosno 20 sekundi (za kontaktni ugao) brzinom od 6 sličica u sekundi. Merenja su vršena u ambijentalnim uslovima pri temperaturi 22 ± 2 $^{\circ}$ C. Svi rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD gde je $n = 3$.

Dodatno, vrednosti koeficijenta rasprostiranja izračunate su za sve ispitivane formulacije korišćenjem jednačine:

$$S = \sigma (\cos\theta - 1)$$

Jednačina 3.3

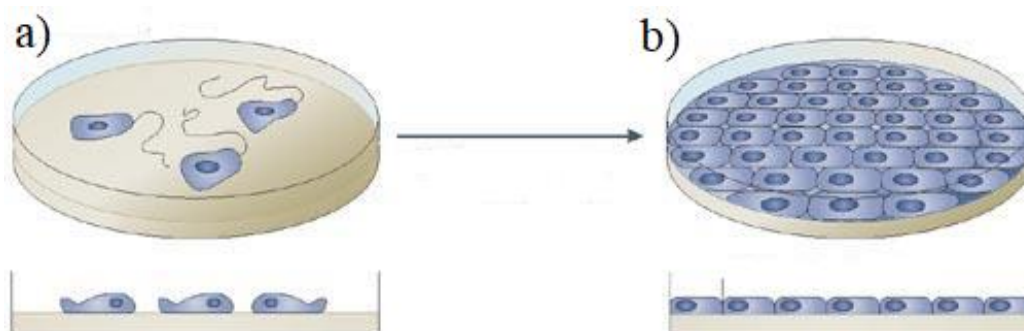
gde je σ površinski napon tečnog uzorka. Ako je kontaktni ugao (θ) veći od 0° , izraz $(\cos\theta - 1)$ i vrednost S imaće negativnu vrednost. Potpuno ili spontano vlaženje nastaje kada je vrednost kontaktnog ugla 0° [142].



Slika 3.2. Theta-Optical Tenziometar

3.2.2.5 Uslovi uzgoja HCE-T ćelija i kultivacija *in vitro* ćelijskih modela

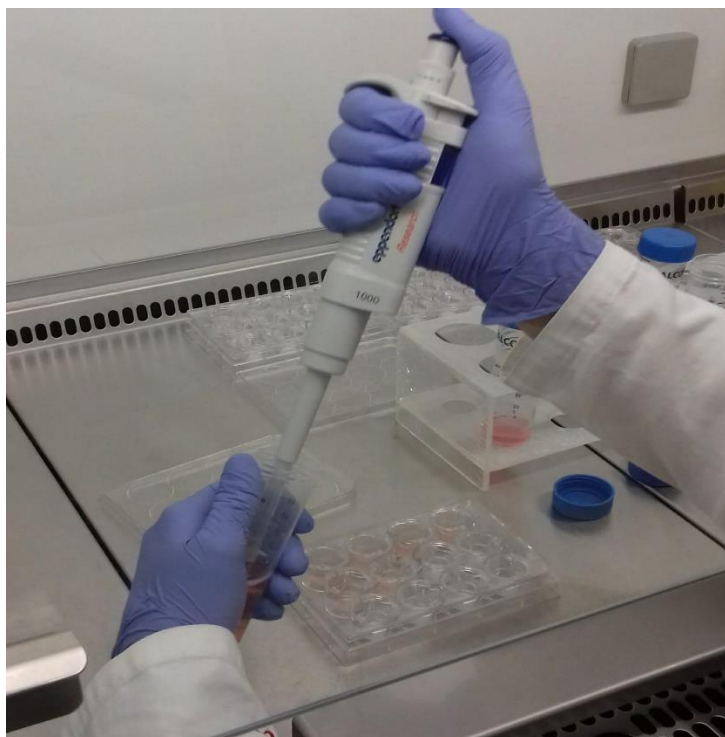
Za pripremu *in vitro* modela rožnjače korišćena je ćelijska linija humanih epitelnih ćelija rožnjače (HCE-T; RIKEN Cell Bank, Japan). Besmrtno ćelije uzgajane su u sterilnim uslovima u tikvicama za uzgoj ćelija u inkubatoru pri temperaturi 37 °C i vlažnosti vazduha od 95%, u atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. Medijum za uzgoj DMEM/F-12 je menjan na svakih 48 h sve dok nije postignuta konfluentnost ćelija (dok nije došlo do stapanja ćelija) (slika 3.3), nakon čega su ćelije presađene na novu površinu za rast. To je učinjeno tako što je prvo uklonjen medijum, a potom su ćelije isprane PBS-om. Ćelije su od zida tikvice za uzgoj odvajane enzimski, dodatkom enzima tripsina. Nakon toga je mikroskopskim pregledom utvrđen sferični oblik ćelija koje su plutale u medijumu čime je potvrđeno njihovo odvajanje od površine, a zatim je dodatkom medijuma koji sadrži serum inhibirana aktivnost tripsina. Ćelije su odvojene centrifugiranjem upotrebom centrifuge (Model 5702 R, Eppendorf, Nemačka) pri brzini od 800 o/minuti u toku 3 minuta. Supernatant je aspiriran, a ćelije su potom suspendovane u svežem medijumu. Nakon toga je određen broj ćelija po ml medijuma pomoću hemocitometra.



Slika 3.3. Šematski prikaz proliferacije ćelija: a) na početku uzgoja i b) nakon što je postignuta konfluentnost (prilagođeno iz [143])

Ćelije su potom zasejane na dve polikarbonatne membrane različite veličine pora (Transwell[®], veličine pora 0,4 μm za HCE-T Model I i 3 μm za HCE-T Model II; Corning Inc., SAD). Membrane su prethodno obložene kolagenom i fibronektinom tako što je prvo dodato po 150 μl rastvora kolagena (1,5 mg/ml) u svaki bunarić (slika 3.4), a potom sprovedena inkubacija na

temperaturi od 37 °C tokom 5 h. Nakon toga je uklonjen kolagen, a dodato je po 400 μ l rastvora fibronektina (10 μ g/ml) u svaki bunarić te ponovo sprovedena inkubacija u toku 20 minuta na istoj temperaturi. Nakon završenog inkubiranja, rastvor je uklonjen i polikarbonatne membrane su bile spremne za zasejavanje ćelija.



Slika 3.4. Zasejavanje ćelija na polikarbonatne membrane

U donorski deo dodato je po 0,5 ml medijuma koji sadrži 10^5 suspendovanih HCE-T ćelija, dok je u akceptorski deo dodato po 1,5 ml medijuma za uzgoj. Ćelije su čuvane na temperaturi od 37 °C, a za to vreme medijum za uzgoj je menjan svežim medijumom na svakih 48 h. Dodatno, praćen je transepitelni električni otpor (engl. *Transepithelial Electrical Resistance*, TEER) pomoću voltmetra Millicell ERS-2 opremljenog STX01 elektrodom (Merck Millipore, SAD) (slika 3.5). Nagli skok u vrednosti TEER, što se uobičajeno dešava između 4. i 7. dana, ukazuje da je došlo do stvaranja čvrstih veza između ćelija. Nakon toga, svi bunarići su izloženi vazduhu u naredna 72 h kako bi se podstakla deoba ćelija i izgradnja višeslojnog epitela.



Slika 3.5. Voltmetar Millicell ERS-2 za merenje TEER

Vrednost TEER-a (izražena u $\Omega \text{ cm}^2$) je korišćena kako bi se procenila barijerna svojstva i integritet epitela rožnjače, a dobijena je oduzimanjem otpora same membrane od srednje vrednosti tri merenja za svaki bunarić i množenjem vrednošću TEER-a površine membrane ($1,12 \text{ cm}^2$). Tokom izlaganja ćelija vazduhu na Transwell® ploču se postavlja metalna ploča i time se zapremina receptorskog dela povećava sa 1,5 ml na 2,0 ml. Nakon 72 h izloženosti vazduhu, ćelijski modeli su bili spremni za studije permeabilnosti, odnosno biokompatibilnosti.

U donorske delove svakog bunarića dodato je po 500 μl medijuma i nakon toga je izmeren otpor. Medijum je potom aspiriran i ćelije su isprane sa po 200 μl PBS-a nakon čega su metalne ploče uklonjene, a bunarići preneseni na čiste Transwell® ploče sa 12 polja. Potom je u donorski deo dodato po 500 μl HBSS-a (pH 5,5), a u akceptorski po 1500 μl . Ćelije su nakon toga inkubirane na temperaturi od 37 °C tokom narednih 30 minuta, a po isteku tog perioda još jednom je izmeren otpor, te je započeta studija permeabilnosti.

3.2.2.6 Studija permeabilnosti na HCE-T ćelijskim modelima

Permeabilnost model lekovitih supstanci ispitana je na dva različita modela humane rožnjače, Modelu I (0,4 μm veličina pora) i Modelu II (3 μm veličina pora).

HBSS u donorskom delu zamenjen je sa po 500 μl uzorka koji su predstavljale ispitivane formulacije kapi za oči razblažene u HBSS-u. Pre početka studije u cilju određivanja vijabilnosti modela i odgovarajućih uslova ispitivanja, testirane su samo dve formulacije koje su sadržavale OLO i komercijalno dostupne kapi za oči sa OLO, uz različito razblaženje u HBSS-u (5 puta, 10 puta i nerazblažene). Nakon dobijenih rezultata preliminarnih ispitivanja, permeabilnost lekovitih supstanci je ispitana uz razblaženje od 10 puta u HBSS-u (za obe model lekovite supstance), slično prethodno utvrđenim protokolima [144, 145]. Svi uzorci su testirani u triplikatu. Permeacija je praćena tokom 2 h na 34 °C uz korišćenje orbitalnog šejker inkubatora (Orbital Shaker–Incubator ES-20/60, Biosan, Republika Letonija) pri brzini mešanja od 50 rpm. U tačno definisanim vremenskim intervalima (20, 40, 60, 80, 100 i 120 minuta) uzimani su alikvoti (500 μl) iz akceptorskog dela i odmah zamenjeni istom količinom svežeg HBSS-a (pH 5,5) prethodno zagrejanog na temperaturu od 34 °C. Na kraju eksperimenta uzeti su uzorci i iz donorskog dela. U uzorcima je određen sadržaj lekovitih supstanci (OLO i KF), odgovarajućom LC-MS/MS metodom (odeljak 3.2.2.9).

Kako bi se utvrdio eventualni uticaj korišćenih polimera, pre svega MMW CS, na čvrste međućelijske veze i uspešnost barijerne funkcije epitela, tokom studije permeabilnosti na Modelu II meren je TEER u precizno definisanim vremenskim intervalima. Nakon završene studije permeabilnosti, ćelije su isprane sa po nekoliko mililitara HBSS-a, prenesene na novu ploču, a potom izložene vazduhu tokom narednih 24 h u 2 ml medijuma (DMEM-F12) pri 37 °C. Po isteku ovog perioda, izvršeno je ispitivanje vijabilnosti ćelija metodom 3.2.3.1.

Rezultati su prikazani kao kumulativna količina permeiranog leka po jedinici površine u zavisnosti od vremena. Prividni koeficijent permeabilnosti (P_{app} u cm/s) za OLO i KF iz različitih formulacija izračunat je iz lineranog dela permeacione krive prema jednačini:

$$P_{app} = \frac{\partial Q}{\partial t} \times \frac{1}{AC_0} \quad \text{Jednačina 3.4}$$

gde je $\frac{\partial Q}{\partial t}$ brzina permeacije (količina permeiranog leka u jedinici vremena), A je površina membrane za permeaciju, a C_0 je početna koncentracija lekovite supstance.

Balans mase (%) izračunat je na osnovu sledeće jednačine:

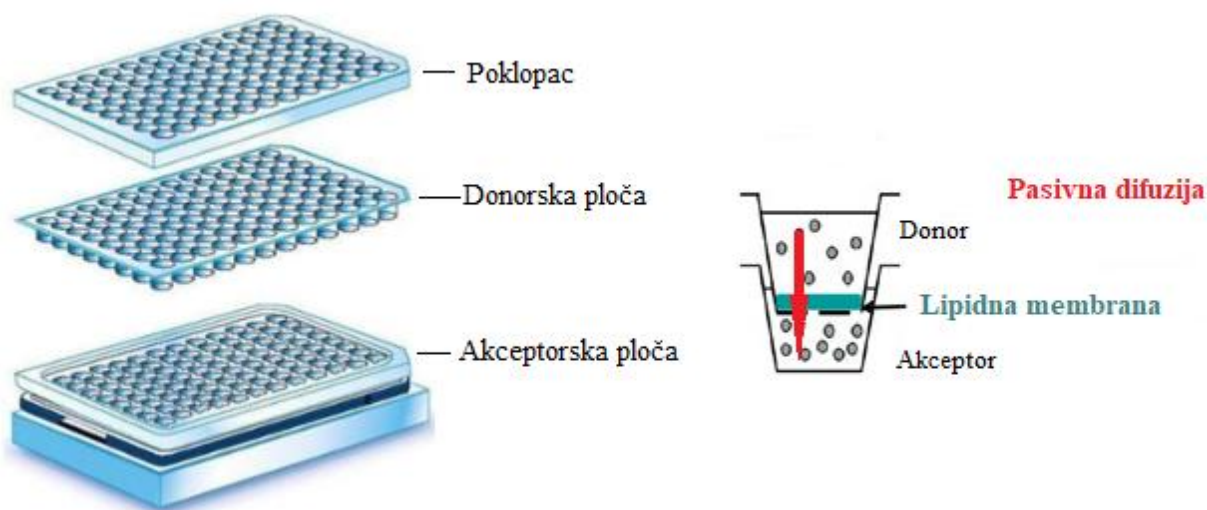
$$\text{Balans mase (\%)} = \frac{(Cr(f) \times Vr + \sum Cr(t) \times Vs) + Cd(f) \times Vd}{Cd(0) \times Vd} \times 100 \quad \text{Jednačina 3.5}$$

gde su C_d i C_r koncentracije lekovite supstance u donorskom (d) i akceptorskom (receptorskom) dijelu (r), redom, na početku (0) i na kraju (t) studije permeabilnosti, $C_r(t)$ je koncentracija uzoraka koji su uzimani iz akceptorskog dijela u definisanim vremenskim intervalima, V_r i V_d predstavljaju volumene akceptorskog i donorskog dijela, redom, dok je V_s volumen uzorka uzimanog iz akceptorskog dela.

3.2.2.7 Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA)

Model veštačke membrane koji simulira rožnjaču zasnovan je na upotrebi fosfatidilholina kao fosfolipidnog sloja [107]. Kao donorski rastvori korišćene su ispitivane kapi za oči sa model lekovitim supstancama. Nosač veštačke membrane predstavljala je filtraciona ploča koju je činilo 96 bunarića (hidrofobni poliviniliden fluorid, veličina pora 0,45 μm Millipore, Irska) i donorska ploča (slika 3.6).

U cilju pripreme lipidne membrane, lecitin jajeta (> 99%) rastvoren je u smeši rastvarača (70% (V/V) heksana, 25% (V/V) dodekana i 5% (V/V) hloroforma), a potom je svaki bunarić donorske ploče obložen lipidnim rastvorom (5 μl u svakom bunariću, koncentracije 10,67 (m/V)). Nakon toga, izvršeno je uparavanje heksana i hloroforma do formiranja lipidne membrane u svakom bunariću. Potom je donorska ploča postavljena na akceptorsku ploču u koju je prethodno dodato 300 μl PBS-a (pH 7,4), a 150 μl PBS rastvora je preneto na donorsku ploču i ploče su inkubirane tokom 4 h na 22 ± 2 °C. Donorska ploča prekrivena je parafilmom i poklopcem kako bi se sprečilo isparavanje.



Slika 3.6. Šematski prikaz PAMPA testa (prilagođeno iz [107])

Po završetku inkubacije, PAMPA sendvič je razdvojen. Koncentracije lekovitih supstanci u donorskom i akceptorskom odeljku su određene odgovarajućim analitičkim metodama (odeljak 3.2.2.9). Takođe, određena je koncentracija lekovitih supstanci u donorskom odeljku na početku samog eksperimenta. Određivanje je vršeno u triplicatu za svaki uzorak.

Efektivna permeabilnost i zadržavanje lekovitih supstanci u membrani izračunati su na osnovu jednačine:

$$P_e = \frac{-2,303}{A \times (t - \tau_{ss})} \cdot \left(\frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \lg \left[-r_v + \left(\frac{1 + r_v}{1 - MR} \right) \times \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right] \quad \text{Jednačina 3.6}$$

gde je P_e koeficijent efektivne permeabilnosti (cm/s), A je površina filtera (0,3 cm^2), V_D i V_A predstavljaju volumene donorskog (0,15 cm^3) i akceptorskog (0,3 cm^3) odeljka, t je vreme inkubacije

(s), τ_{ss} je vreme potrebno za postizanje ravnotežnih uslova (s), $C_D(t)$ je koncentracija ispitivane lekovite supstance u donorskom odeljku u vremenu t (mol/cm^3), $C_D(0)$ je koncentracija ispitivane lekovite supstance u donorskom odeljku u vremenu 0 (mol/cm^3), r_v predstavlja odnos zapremina donorskog i akceptorskog odeljka (V_D/V_A), a MR je faktor zadržavanja u membrani koji se definiše kao:

$$MR = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A C_A(t)}{V_D C_D(0)} \quad \text{Jednačina 3.7}$$

3.2.2.8 Ispitivanje stabilnosti

Fizičko-hemijska stabilnost formulisanih kapi za oči sa lekovitim supstancama ispitana je u definisanim vremenskim intervalima tokom godinu dana čuvanja u frižideru (4 ± 1 °C) i na ambijentalnoj temperaturi 22 ± 2 °C. Parametri koji su praćeni u cilju procene stabilnosti su izgled, bistrina (vizuelno), pH vrednost, osmolalnost, viskozitet (kod uzoraka čuvanih na 22 ± 2 °C) i sadržaj lekovitih supstanci. Sadržaj OLO i KF određen je primenom metode tačne hromatografije (HPLC) (odjeljak 3.2.2.9).

Dodatno, sprovedena je studija ubranog ispitivanja stabilnosti primenom metode cikličnih promena temperature (tzv. stres studija stabilnosti). Izvedeno je ukupno šest ciklusa izmene uslova čuvanja uzorka na temperaturama: $2-8$ °C (čuvanje u frižideru) i 40 °C (čuvanje u termostatu) sa zadržavanjem na svakoj temperaturi ne kraće od 48 h. Po završetku studije izvršeno je ispitivanje sledećih parametara: izgleda, bistrine, pH vrednosti, osmolalnosti, viskoziteta i sadržaja lekovitih supstanci (3.2.1.2–3.2.1.4). Merenje viskoziteta (3.2.1.7) je izvedeno 24 h nakon poslednjeg ciklusa hlađenja – zagrevanja.

3.2.2.9 Određivanje sadržaja lekovitih supstanci

Kvantitativna analiza OLO tokom praćenja hemijske stabilnosti formulisanih kapi za oči i PAMPA testa sprovedena je primenom HPLC metode koristeći Agilent 1200 sistema (Agilent Technologies, SAD), opremljenog binarnom pumpom, manualnim injektorom i DAD detektorom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB C18 ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ veličina čestica). Mobilna faza je bila smeša acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata u odnosu 40:60 (V/V). Temperatura kolone je podešena na 45 °C, a brzina protoka na $0,5 \text{ ml}/\text{min}$. Detekcija je izvršena na talasnoj dužini od 210 nm.

Određivanje sadržaja OLO u eluatima prikupljenim u toku studije permeabilnosti na *in vitro* ćelijskim kulturama vršena je primenom LC-MS/MS metode, uz korišćenje UHPLC hromatografa ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Korišćena je ista kolona uz istu temperaturu i protok kao kod navedene HPLC metode, uz mobilnu fazu koja se sastojala od acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata u odnosu 50:50 (V/V). Detekcija i kvantifikacija OLO izvršena je u pozitivnom HESI modu ($m/z = 338,2-247,1$).

Sadržaj KF u studiji procene kornealne permeabilnosti na HCE-T modelima određen je primenom iste metode uz korišćenje mobilne faze koja se sastojala od smeše acetonitril/20 mM amonijum-acetat u odnosu 80:20 (V/V). Temperatura kolone je podešena na 45 °C, a brzina protoka na $0,5 \text{ ml}/\text{min}$. Detekcija KF je izvršena u HESI modu ($m/z = 310,1-96,2$).

Koncentracija KF u svim uzorcima prikupljenim tokom studije rastvorljivosti, stabilnosti, procene permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA) određena je primenom HPLC metode korišćenjem Dionex Ultimate 3000 sistema (Thermo Fisher Scientific, Njemačka), opremljenog Dionex Ultimate 3000 kvaternom pumpom, autosamplerom i DAD detektorom. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB C18 ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ veličina čestica). Mobilna faza sastojala se od smeše acetonitrila i 20 mM amonijum-acetata (50:50, V/V). Brzina protoka je podešena na $1 \text{ ml}/\text{min}$, a temperatura kolone na 45 °C. UV detekcija je izvršena na talasnoj dužini od 230 nm.

3.2.2.10 Statistička analiza

Statistička analiza dobijenih rezultata u toku druge faze eksperimentalnog rada, prilikom merenja površinskog napona i kontaktnog ugla sprovedena je korišćenjem programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., SAD; www.graphpad.com). Tokom statističke analize korišćen je ANOVA test uz dopunu multiparametarskim Tukey's post-hoc testom (granica statističke značajnosti $p < 0,05$).

3.2.3 Treća faza eksperimentalnog rada

Poslednja faza eksperimentalnog rada obuhvatala je procenu biokompatibilnosti izrađenih formulacija na dva HCE-T ćelijska modela, nakon studija permeabilnosti. Biokompatibilnost je procenjena na osnovu vijabilnosti ćelija tretiranih ispitivanim formulacijama sprovođenjem MTT testa.

Formulacije koje su pokazale najbolju vijabilnost ćelija i najnižu citotoksičnost predstavljale su uzorke za *in vivo* studiju procene efikasnosti u suzbijanju osećaja svraba i bola nakon primene rastvora histamina na oku miševa. Kao referenti uzorci u ovoj fazi istraživanja, korišćeni su komercijalno dostupni preparati kapi za oči sa lekovitim supstancama koje su predmet istraživanja.

3.2.3.1 Procena biokompatibilnosti ispitivanih formulacija

Biokompatibilnost je procenjena primenom MTT testa koji se zasniva na merenju aktivnosti mitohondrijalnog enzima sukcinil-dehidrogenaze [146]. Ćelijska sukcinil-dehidrogenaza redukuje MTT u formazan, ljubičasto obojeno jedinjenje. Formazan je nerastvoran u vodi, ali se rastvara u organskom rastvaraču izopropanolu. Apsorbancija rastvora formazana proporcionalna je broju metabolički aktivnih ćelija [146].

MTT test je sproveden 24 h nakon završene studije permeabilnosti, na oba modela. Ćelije su za to vreme čuvane u inkubatoru na 37 °C u medijumu za ishranu. Pre izvođenja samog testa, medijum je aspiriran i dodato je po 700 µl rastvora MTT u receptorski i donorski deo. Rastvor MTT je pripremljen u PBS-u, a potom razblažen 10 puta sa medijumom za ishranu ćelija do konačne koncentracije 0,5 mg/ml. Svi uzorci su ispitivani u triplikatu. Nakon dodavanja MTT-a ćelije su inkubirane u toku 3 h na temperaturi od 37 °C nakon čega je rastvor u potpunosti aspiriran i zamenjen sa po 700 µl izopropanola koji predstavlja rastvarač za kristale formazana. Ploče su potom postavljene u orbitalni šejker radi mešanja do potpunog rastvaranja. Nakon toga, po tri uzorka iz svakog bunarića prebačeni su na ploču sa 96 bunarića.

Izvršeno je merenje apsorbancije rastvora formazana na talasnoj dužini 570 nm uz pomoć mikrotitarskog čitača mikroploča (1420 Multilabel counter VICTOR³, Perkin Elmer, Waltham, SAD). Izopropanol je korišćen kao slepa proba i njegova apsorbancija je oduzeta od vrednosti apsorbancije svih ostalih uzoraka. Ćelije inkubirane u HBSS-u su služile kao kontrola ćelijske vijabilnosti.

3.2.3.2 *In vivo* studija procene efikasnosti odabranih formulacija kapi za oči

Efikasnost formulisanih kapi za oči baziranih na polisaharidnim polimerima koje sadrže model lekovite supstance (KF i OLO) u otklanjanju svraba procenjena je u modelu alergijskog konjunktivitisa na miševima muškog pola, soja C57BL/6 (slika 3.7).



Slika 3.7. Miš muškog pola (soj C57BL/6)

3.2.3.2.1 Čuvanje eksperimentalnih životinja

Svi eksperimenti na životinjama su sprovedeni u skladu sa smernicama EU direktive 2010/63/EU o korišćenju životinjskih vrsta u naučne svrhe i poštovanje protokola odobrenog od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta. Životinje, miševi soja C57BL/6, su dobijene iz Uzgajališta Vojnomedicinske akademije u Beogradu (Srbija).

Životinje su dopremene u vivarijum 7 dana pre početka eksperimenta radi prilagođavanja. Miševi (telesne mase 20–30 g) čuvani su u vivarijumu u kavezima od pleksiglasa pod standardnim laboratorijskim uslovima: kontrolisani uslovi temperature 22 ± 1 °C i relativne vlažnosti vazduha 60%, sa dnevno/noćnim ciklusom od 12/12 h. Hrana (Veterinarski institut, Zemun) i voda su bili dostupni 24 h izuzev u vreme trajanja eksperimenta. Životinje su radi prilagođavanja smeštane u komore od pleksiglasa ($30 \times 25 \times 25$ cm³) za posmatranje 15 minuta pre početka eksperimenta. Svi eksperimenti su izvođeni u isto vreme, u periodu od 8 h do 16 h, kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevioralnim testovima.

3.2.3.2.2 Protokol in vivo ispitivanja

Efikasnost odabranih formulacija antihistaminika u poređenju sa komercijalnim preparatima ispitivana je u testu svraba oka na miševima (model akutnog alergijskog konjunktivitisa), koji je izvođen prema proceduri opisanoj u literaturi [129, 147]. Histamin-dihidrohlorid (Sigma-Aldrich Chem. Co.) rastvoren je u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,4) i korišćen kao pruritogen. Nakon privikavanja od 15 minuta, rastvor histamina (46 µg histamina u 2,5 µl PBS) ukapavan je direktno u donju konjunktivalnu vrećicu miša (jednostrano) pomoću mikropipete, pri čemu su miševi pridržavani rukom uz blago povlačenje donjeg kapka. Nakon toga, miševi su postavljeni individualno u komore za posmatranje i karakteristično ponašanje indukovano histaminom, praćeno je 30 minuta nakon ukapavanja istog.

Tipičan odgovor miševa na primenjeni histamin sastoji se od epizoda češanja zadnjom ipsilateralnom šapom, koje ukazuju na senzaciju svraba kod glodara. Takođe se mogao primetiti postupak trljanja tretiranog oka prednjom ipsilateralnom šapom, koji ukazuje na senzaciju bola kod glodara što je takođe kvantifikovano. Epizoda češanja kao reakcija na svrab se definiše od momenta kada životinja podigne ipsilateralnu zadnju šapu, češe površinu oka (obično snažni, brojni pokreti) i završava se postavljanjem šape na pod ili u usta. Češanje se ponekada dešava prevelikom brzinom, zbog čega su kvantifikovane epizode/napadi češanja. Epizoda trljanja oka definiše od momenta kada

životinja podiže ipsilateralnu prednju šapu, trlja područje oka (obično nežni, pojedinačni pokreti) i vraća se u prvobitni početni položaj [147]. Jednostrano češanje/trljanje kontralateralnog oka, kao i istovremeno trljanje oka obema prednjim šapama (uobičajeno ponašanje glodara) nisu praćeni. Stoga, računat je samo broj epizoda unilateralnog češanja/trljanja oka izloženog histaminu. Da bi se ispitala efikasnost kapi za oči (referentni proizvod i odabrane nove formulacije), uključujući i praćenje dužine trajanja dejstva, kapi za oči koje sadrže lek ukapavane su 15, 60 i 120 minuta pre primene histamina i životinje su izlagane istom eksperimentalnom postupku.

Statistička analiza bihevioralnog eksperimenata sprovedena je pomoću programa SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Richmond, CA, SAD). Rezultati su predstavljeni kao srednji broj epizoda češanja/trljanja \pm SEM dobijeni iz grupa od 7–13 životinja. Razlike između dobijenih vrednosti proverene su dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), nakon čega je usledio Tukey HSD post hoc test. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 REZULTATI PRVE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

4.1.1 Fizičko-hemijska karakterizacija vehikuluma

U cilju odabira odgovarajućih koncentracija polimera u sastavu vehikuluma optimalnih fizičko-hemijskih i funkcionalnih osobina za oftalmološke preparate, pripremljeni su vehikulumi sa različitim rasponima koncentracija polimera (tabela 3.2).

Koncentracije HEC (0,5%) i HPMC (0,5% i 1,0%) su odabrane na osnovu literaturnih podataka s obzirom da se derivati celuloze uobičajeno koriste za povećanje viskoziteta oftalmoloških preparata i kao lubrikansi koji smanjuju trenje između rožnjače i kapaka. Pored toga, za HEC se u literaturi navodi da poseduje i mukoadhezivna svojstva. Preporučene koncentracije za navedene derivate celuloze bile su u rasponu od 0,2–0,5% [7]. U ovoj fazi ispitivan je i preparat Hipromeloza, kapi za oči 0,3 % (tabela 3.3), izrađen prema propisu Magistralnih formula 2008 [137] koji se koristi kao lubrikans u terapiji sindroma suvog oka tj. kod stanja sa smanjenim lučenjem suza.

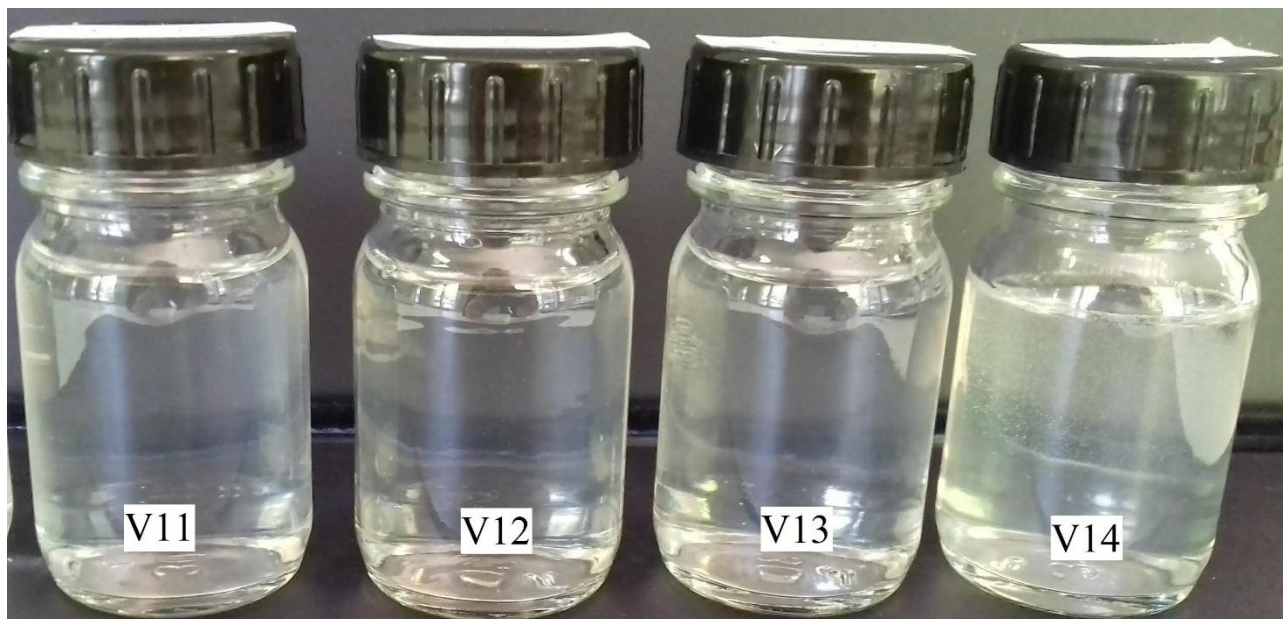
Neposredno nakon izrade vehikuluma, kao i 24 h nakon izrade ispitivani su izgled, bistrina, pH vrednost i osmolalnost (tabela 4.1).

Tabela 4.1. Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije izrađenih vehikuluma

Vehikulum	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14
Izgled vehikuluma neposredno nakon pripreme	Bistar	Bistar	Blago opalescentan	Blago opalescentan	Bistar	Bistar	Bistar	Blago opalescentan	Blago opalescentan	Gelaste strukture, ne teče	Blago opalescentan	Bistar	Bistar	Bistar
Boja	Bezbojan	Bezbojan	Žućkast	Žućkast	Žućkast	Žućkast	Bezbojan	Beličast	Beličast	Beličast	Beličast	Bezbojan	Bezbojan	Bezbojan
pH nakon pripreme	6,6	6,7	5,8	5,8	5,9	5,8	6,6	6,9	6,9	7,4	7,4	5,5	7,2	7,4
Osmolalnost (mOsmol/kg)	310	313	310	328	329	250	290	324	297	299	255	280	306	284
Izgled vehikuluma 24h nakon pripreme	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Opalescentan	Opalescentan	Opalescentan	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
Boja 24h nakon pripreme	Bezbojan	Bezbojan	Žućkast	Žućkast	Žućkast	Žućkast	Bezbojan	Beličast	Beličast	Beličast	Beličast	Bezbojan	Bezbojan	Bezbojan
pH 24 h nakon pripreme	6,4	6,6	5,9	5,8	5,9	5,7	6,4	6,8	6,9	7,4	7,4	5,5	7,2	7,4
Osmolalnost 24 h nakon pripreme (mOsmol/kg)	310	313	310	328	329	250	290	324	297	299	255	280	306	284

Svi izrađeni vehikulumi bili su bistri neposredno nakon izrade, kao i nakon 24 h. Izuzetak su bili uzorci sa 1,0% (V8) i 1,5% HP 40 GG (V10) kod kojih je uočena blaga opalescencija koja se može pripisati prisustvu HP GG u višim koncentracijama. Dodatno, vehikulum V10 imao je konzistenciju mekog gela. Vehikulumi izrađeni sa hitozanom bili su bistri, ali za razliku od ostalih vehikuluma, svetlo žute boje.

Na slici 4.1. prikazan je izgled vehikuluma koji sadrže kombinacije polimera (24 h nakon izrade). Poznato je da prisustvo polimera u tečnim formulacijama može umanjiti bistrinu, što potencijalno može predstavljati kritični parametar kvaliteta preparata koji sadrže kombinacije različitih polimera [23].



Slika 4.1. Izgled ispitivanih vehikuluma V11, V12, V13 i V14 (24 h nakon izrade)

pH vrednosti ispitivanih vehikuluma koji sadrže hitozan bile su u opsegu 5,5–5,9, a ostalih vehikuluma u opsegu 6,4–7,4 (tabela 4.1). Kako bi se obezbedila fiziološka prihvatljivost na oku i fizičko-hemijska stabilnost, pH vrednosti su podešene dodavanjem 0,1M HCl ili 0,1M NaOH. pH vrednost izvan fiziološki prihvatljivih granica (5,0–8,5) utiče na povećanje lučenja suza čime se skraćuje vreme zadržavanja primenjenog preparata na površini oka, a pored toga vrednost pH može uticati na permeaciju lekovitih supstanci kroz rožnjaču [2]. Prilikom izrade vehikuluma koji sadrže hitozan, početna pH vrednost je niska što potiče od 1 %-tnog rastvora sirćetne kiseline u kojem su pripremljeni osnovni rastvori polimera. pH vrednost je podešavana na odgovarajuće vrednosti dodavanjem 0,1M NaOH, s obzirom na podatak da hitozan pri pH vrednostima višim od 6,2 obrazuje precipitate slične gelu [148].

Toničnost kapi za oči može da se kreće u širokom opsegu i ekvivalentna je toničnosti rastvora natrijum-hlorida koncentracije od 0,5% do 2,0%, što odgovara rasponu osmolalnosti od 205 do 684 mOsmol/kg, bez značajnih poremećaja u homeostazi oka. Kod pacijenta koji pate od sindroma suvog oka (suvog keratonjunktivitisa) i Sjörgen-a, suzna tečnost je hipertonična i prijatniji osećaj na oku obezbeđuju kapi za oči niže osmolalnosti [2, 149].

U toku preliminarnih ispitivanja, u cilju procene uticaja upotrebljenih polimera na osmotske karakteristike rastvora, pripremljeni su rastvori MMW CS (1%, m/V), MMW CS (0,2%, m/V), LMW CS (0,5%, m/V), HP 40 GG (0,5%, m/V) i NH (0,4%, m/V) čija osmolalnost je iznosila redom 257 mOsmol/kg, 43 mOsmol/kg, 286 mOsmol/kg, 3 mOsmol/kg i 4,7 mOsmol/kg. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da HP 40 GG i NH, slično derivatima celuloze ne utiču na toničnost rastvora, dok uticaj hitozana nije bio zanemarljiv. Toničnost izrađenih vehikuluma je podešena dodavanjem odgovarajućih izračunatih količina natrijum-hlorida. Kod svih ispitivanih uzoraka vrednosti ovog parametra bile su u prihvatljivom opsegu za oftalmološke preparate (tabela 4.1).

4.1.2 Merenje molekulske mase polimera

Generalno, molekulska masa polisaharida smatra se jednom od značajnijih karakteristika koja može uticati na funkcionalna svojstva ovih polimera [21]. Pored stepena deacetilacije, molekulska masa hitozana je najznačajniji faktor koji utiče na viskozitet, mukoadhezivne karakteristike, afinitet vezivanja za lekovite supstance ili proteine, te određuje njegovu upotrebu u lekovitim preparatima [21, 27]. Molekulska masa HP GG direktno utiče na njen intrizički viskozitet koji značajno određuje upotrebu polimera [51]. Studija optimizacije kapi za oči variranjem molekulske mase hijaluronske kiseline u opsegu 250–1100 kDa pokazala je da bolje mukoadhezivne karakteristike pokazuju formulacije koje sadrže hijaluronsku kiselinu nižih molekulskih masa uz povećanje koncentracije biopolimera [49]. Na osnovu sertifikata analize, molekulska masa korišćenog NH je ~1000 kDa.

U literaturi su opisane različite tehnike određivanja molekulske mase hitozana kao što su osmometrijska, tehnika koja se zasniva na rasipanju svetlosti, sedimentaciona, HPLC i viskozimetrijska. Tehnika koja se zasniva na rasipanju svetlosti je vrlo jednostavna i često korišćena za određivanje srednje molekulske mase polimera. Njena glavna prednost ogleda se u mogućnosti merenja širokog raspona molekulskih masa (10^4 do 5×10^6) [21, 150, 151].

Izmerene vrednosti molekulske mase za MMW CS, HP 40 GG i HP GG bile su redom $417,7 \pm 36,2$ kDa, $261,7 \pm 38,1$ kDa i $110,0 \pm 7,5$ kDa.

4.1.3 Reološka karakterizacija izrađenih vehikuluma i poredbenih komercijalnih preparata

4.1.3.1 Reološko ponašanje ispitivanih vehikuluma pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima

Farmaceutski preparati tečne konzistencije namenjeni za lokalnu primenu na oku treba da poseduju odgovarajući viskozitet koji će omogućiti laku primenu preparata iz odgovarajućeg kontejnera. Poznato je da povećanje viskoziteta oftalmoloških preparata dovodi do produženog zadržavanja preparata na površini oka, što obezbeđuje bolju okularnu raspoloživost i poboljšanje farmakološkog efekta. Međutim, u zavisnosti od upotrebene lekovite supstance ili formulacije, postoji plato, nakon kojeg dalje povećanje viskoziteta vrlo malo doprinosi ili uopšte više ne utiče na terapijski efekat [152]. Isuviše visok viskozitet izaziva neprijatan osećaj kod pacijenata poput zamućenja vida, što značajno utiče na komplijansu [152, 153].

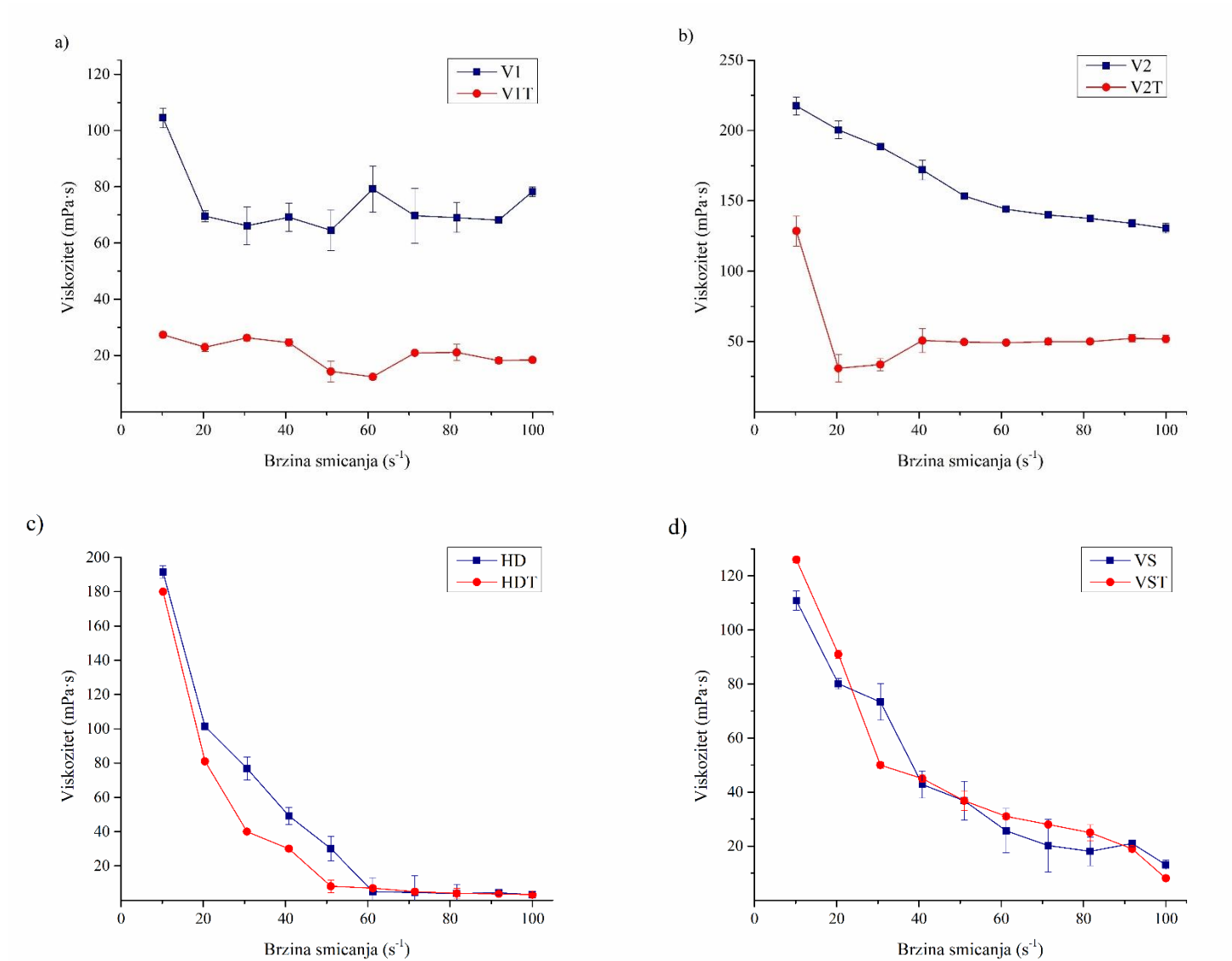
Humana suzna tečnost predstavlja dinamično okruženje. Čovek trepne svakih nekoliko sekundi i pri svakom treptaju kapci indukuju brzinu smicanja od $4250\text{--}28500\text{ s}^{-1}$, dok se u periodima između treptanja brzina smicanja smanji na $0,03\text{ s}^{-1}$ [154].

Reološka analiza pored izrađenih vehikuluma obuhvatila je i komercijalno dostupne preparate. Sva četiri analizirana komercijalna preparata (HD, SU, SGD i Pro) (tabela 3.3) predstavljaju preparate koji su namenjeni za tretman sindroma suvog oka, s tim da su samo kapi za oči HD registrovane kao lek, dok se ostali proizvodi na tržištu Republike Srbije nalaze registrovani kao medicinska sredstva u kategoriji oftalmoloških i optičkih sredstava pod generičkim nazivom kapi za vlaženje i negu oka. Komercijalni preparati su odabrani na osnovu indikacije za njihovu primenu i vrste upotrebljenih polimera u cilju poređenja sa karakteristikama izrađenih vehikuluma.

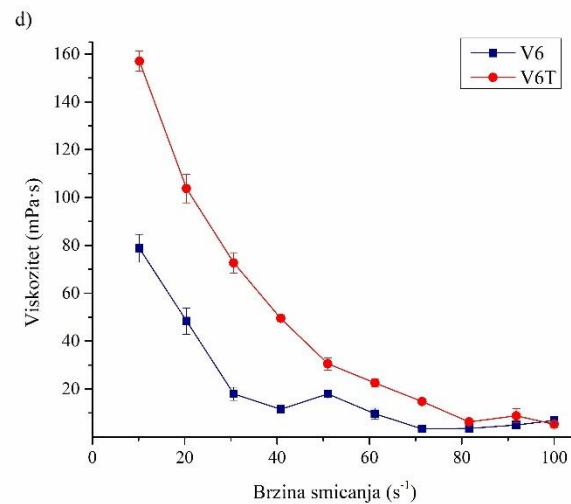
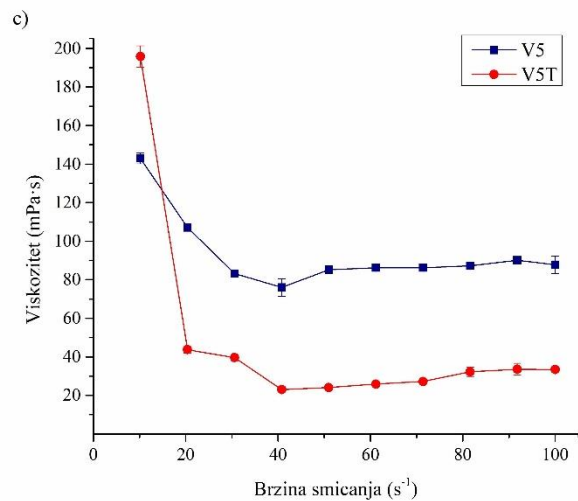
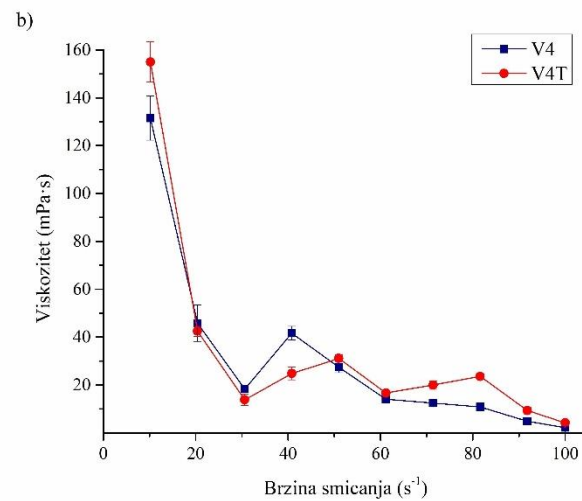
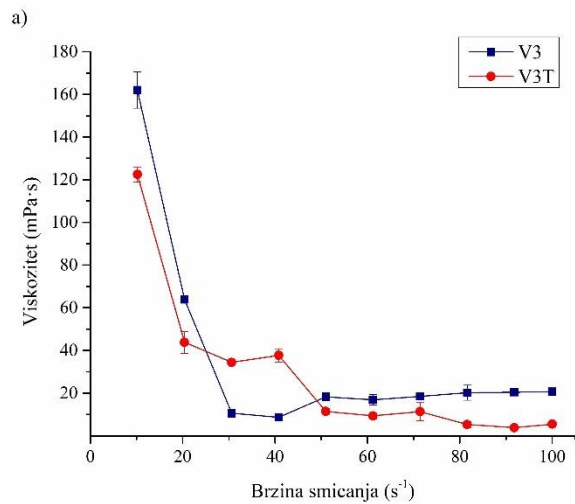
Oftalmološki preparati ne treba da utiče na ponašanje suznog filma ili da utiču u što manjoj mogućoj meri. Zbog pseudoplastičnih svojstva suzne tečnosti, pseudoplastični vehikulumi su mnogo prihvatljiviji od vehikuluma koji ispoljavaju njutnovski tip tečenja, tj. čiji viskozitet je konstantan u odnosu na promenu brzine smicanja [46]. Na slikama 4.2-4.5 prikazane su krive viskoziteta ispitivanih vehikuluma pri ambijentalnim uslovima ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dodatno, na slikama su prikazane i krive viskoziteta ispitivanih vehikuluma i komercijalnih preparata nakon razblaženja sa VST, merene na temperaturi $34\text{ }^{\circ}\text{C}$. Viskoizitet vehikuluma koji sadrže derivate celuloze nije se menjao značajno sa promenom brzine smicanja u rasponu $10\text{--}100\text{ s}^{-1}$ (Slike 4.2a i 4.2b). Sa druge strane, viskoiziteti VS i

komercijalnih HD kapi, značajno su opadali sa porastom brzine smicanja (slike 4.2c i 4.2d). U skladu sa prethodnim studijama [29], može se zaključiti da na reološko ponašanje derivata celuloze u velikoj meri utiče njihova koncentracija.

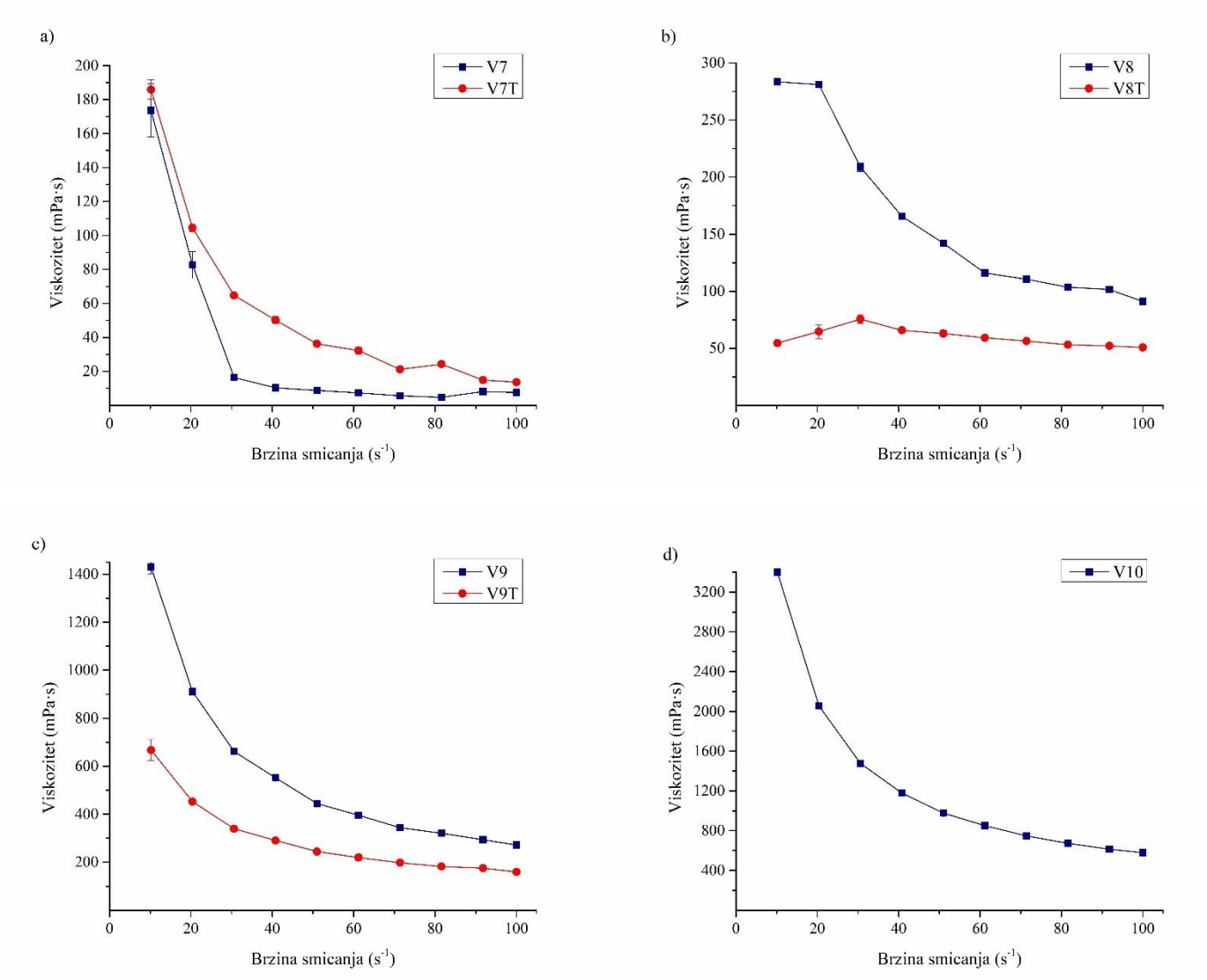
Svi ostali ispitivani vehikulumi, ispoljavali su vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje (slike 4.3-4.5). Ovaj tip tečenja karakteriše nizak viskozitet pri višim brzinama smicanja i obrnuto viši viskozitet pri nižim brzinama smicanja što na oku omogućava duže zadržavanje preparata bez izazivanja osećaja neprijatnosti prilikom treptanja.



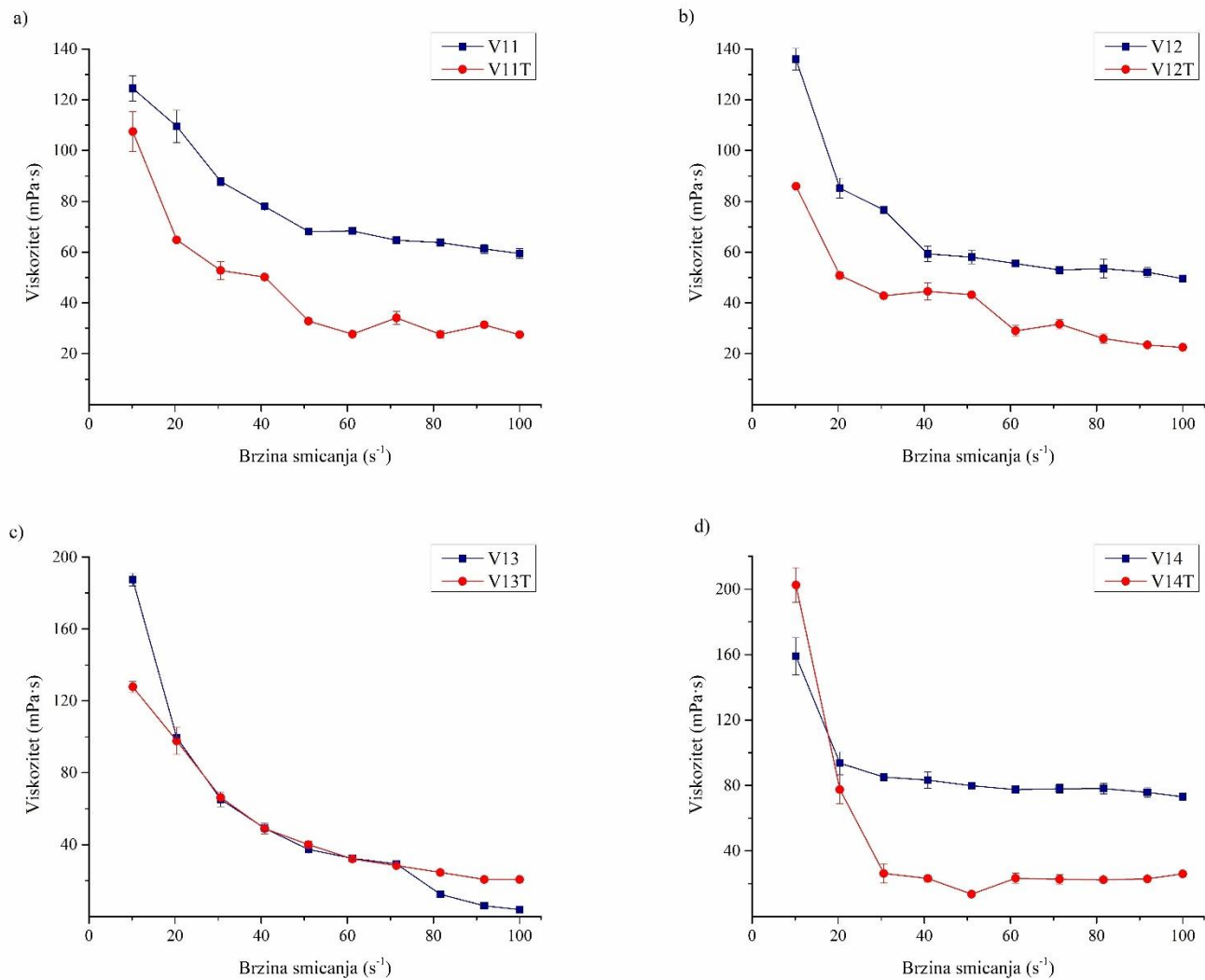
Slika 4.2. Krive viskoziteta ispitivanih uzoraka: a) V1 (20 °C) i V1T (34 °C), b) V2 (20 °C) i V2T (34 °C), c) HD (20 °C) i HDT (34 °C), d) VS (20 °C) i VST (34 °C)



Slika 4.3. Krive viskoziteta ispitivanih uzoraka: a) V3 (20 °C) i V3T (34 °C), b) V4 (20 °C) i V4T (34 °C), c) V5 (20 °C) i V5T (34 °C), d) V6 (20 °C) i V6T (34 °C)



Slika 4.4. Krive viskoziteta ispitivanih uzoraka: a) V7 (20 $^{\circ}C$) i V7T (34 $^{\circ}C$), b) V8 (20 $^{\circ}C$) i V8T (34 $^{\circ}C$), c) V9 (20 $^{\circ}C$) i V9T (34 $^{\circ}C$), d) V10 (20 $^{\circ}C$)



Slika 4.5. Krive viskoziteta ispitivanih uzoraka: a) V11 (20 °C) i V11T (34 °C), b) V12 (20 °C) i V12T (34 °C), c) V13 (20 °C) i V13T (34 °C), d) V14 (20 °C) i V14T (34 °C)

Vrednosti prividnih viskoziteta ispitivanih vehikuluma i komercijalnih preparata pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima, pri različitim brzinama smicanja prikazane su u tabelama 4.2 i 4.3.

Tabela 4.2. Vrednosti prividnih viskoziteta merenih na 20 °C i 34 °C pri različitim brzinama smicanja

Viskozitet (mPa·s)*	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14
25 s⁻¹ (20 °C)	61,1	193,0	47,2	57,3	85,6	35,9	39,7	240,7	813,7	1765	105,7	66,4	83,5	106,8
50 s⁻¹ (20 °C)	59,4	153,5	18,3	27,3	85,2	17,9	8,7	142,0	444,0	977	68,1	58,0	37,3	98,3
75 s⁻¹ (20 °C)	69,0	141,0	17,0	10,8	86,5	11,7	3,6	105,7	328,3	715	65,0	52,4	16,5	77,9
100 s⁻¹ (20 °C)	77,1	130,5	20,7	2,2	87,8	6,8	7,4	91,0	271,7	578	59,5	49,6	3,7	73,1
25 s⁻¹ (34 °C)	14,7	32,5	51,0	35,0	36,1	75,9	74,4	95,0	411,0	-#	24,7	51,2	81,8	51,4
50 s⁻¹ (34 °C)	14,3	49,5	11,4	31,1	24,0	30,5	36,2	62,8	244,5	-#	32,8	43,2	39,9	11,7
75 s⁻¹ (34 °C)	15,2	48,9	5,0	13,0	38,0	12,9	20,6	55,2	193,0	-#	27,0	23,1	26,2	17,3
100 s⁻¹ (34 °C)	18,4	51,7	5,5	4,1	33,4	5,2	13,6	50,7	159,5	-#	27,5	22,5	19,3	26,0

*prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%

#u ovoj fazi vehikulum V10 isključen je iz daljih ispitivanja zbog izrazito visokog viskoziteta (konzistencije mekog gela) na 20 °C

Tabela 4.3. Vrednosti prividnih viskoziteta ispitivanih komercijalnih preparata pri različitim brzinama smicanja na 20 °C i 34 °C

Brzina smicanja (s ⁻¹)	Viskozitet (mPa·s)*									
	SU		SGD		Pro		HD		VS	
	20 °C	34 °C	20 °C	34 °C	20 °C	34 °C	20 °C	34 °C	20 °C	34 °C
25	82,3	83,2	459	255	83,2	86,0	80,8	39,6	77,7	60,9
50	38,3	41,2	307	180	42,9	40,7	30,1	8,1	36,8	36,8
75	21,5	26,8	253	148	21,0	26,9	5,3	5,0	26,1	26,7
100	12,6	19,1	215,5	136	18,9	19,7	3,2	3,2	13,1	8,1

*prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%

Vrednosti prividnih viskoziteta ispitivanih komercijalnih preparata (pri 100 s⁻¹) nalaze se izvan opsega preporučenih vrednosti viskoziteta navedenog za tečne oftalmološke preparate, izuzev preparata koji sadrži NH (18,9 mPa·s). Komercijalne kapi za oči sa hipromelozom (HD) imale su daleko najniže vrednosti prividnog viskoziteta što može biti uzrok njihove brze eliminacije nakon primene i kratkog zadržavanja na površini oka. Izmerene vrednosti ovog parametra bile su u skladu sa literaturnim podacima, tj. da derivate celuloze karakteriše kratkotrajno ispoljavanje efekata u poređenju sa drugim polisaharidnim polimerima [15].

Na osnovu dobijenih vrednosti prividnih viskoziteta vehikuluma sa pojedinačnim polimerima, odabrane su koncentracije polimera za pripremu uzoraka sa kombinacijama polimera u cilju dobijanja lubrikanasa pogodnih vrednosti viskoziteta za oftalmološke preparate. Dodatno, na osnovu podataka o sinergističkom efektu polimera [65, 66], očekuje se da će polimeri korišćeni u smeši, pri minimalnim koncentracijama, omogućiti dobijanje rastvora odgovarajućih vrednosti viskoziteta. Početne koncentracije polimera u ispitivanim uzorcima lubrikanasa odabrane su na osnovu literaturnih podataka, koncentracija polimera u komercijalnim preparatima i rezultata preliminarnih ispitivanja.

Derivat celuloze koji ulazi u sastav ispitivanih vehikuluma, HPMC 4000 mPa·s, obično se koristi u koncentraciji 0,5% (m/V) u cilju povećanja viskoziteta [10]. Radi poređenja, pripremljen je i preparat (Hipromeloza, kapi za oči, 0,3%) prema propisu MF 2008. U monografiji ovog preparata navodi se da kapi za oči deluju kao lubrikans i da je njihova pH vrednost u opsegu 8,4–8,6, dok podaci o viskozitetu preparata nisu navedeni. Međutim, izmereni viskozitet ovog preparata nalazi se ispod opsega preporučenog za oftalmološke preparate (tabela 4.5) i zbog toga nije uključen u dodatna ispitivanja.

U literaturi se navodi podatak da rastvori hitozana u koncentraciji već od 0,5% (m/V) mogu produžiti vreme kontakta preparata sa površinom oka. Sa povećanjem molekulske mase, ne dolazi do poboljšanja efekta, te se zbog toga preporučuje korišćenje hitozana nižih molekulskih masa koji daju rastvore optimalnog viskoziteta, koji se lako primenjuju i dobro podnose na površini oka [39].

S obzirom da na osnovu literaturnih podataka nije bio poznat uticaj upotrebljene koncentracije HP 40 GG na viskozitet rastvora, pripremljeni su vehikulumi šireg raspona koncentracija (0,25%, 0,5%, 1,0% i 1,5%, m/V), u odnosu na druge polimere. Vehikulumi koji sadrže 1%, odnosno 1,5% HP 40 GG pokazali su izrazito visoke vrednosti prividnih viskoziteta. Viskozitet uzorka V9 bio je sličan viskozitetu komercijalnog uzorka SGD, dok je uzorak V10 ispoljio reološko ponašanje slično gelu. S obzirom da navedeni vehikulumi nisu bili odgovarajuće bistrine i homogenosti (tabela 4.1), u ovoj fazi eksperimentalnog rada isključeni su iz daljih istraživanja. Koncentracija HP 40 GG od 0,25% (m/V) odabrana je za kombinovanje sa HEC, MMW CS i NH u cilju procene sinergističkog efekta ovih polimera na viskozitet, reološke i mukodhezivne karakteristike.

Doprinos LMW CS viskozitetu ispitivanog vehikuluma (V3 i V4), za razliku od MMW CS, je dosta nizak i tek pri koncentraciji od 1% (m/V) dobijene su pogodne vrednosti viskoziteta, zbog toga je za izradu vehikuluma koji sadrže kombinacije polimera u svom sastavu odabran MMW CS u koncentraciji 0,5% (m/V). Pored toga, HP 40 GG je imao značajno veći uticaj na viskozitet od MMW CS u istoj koncentraciji (0,5%, m/V). Brojni su faktori koji pored molekulske mase utiču na viskozitet rastvora visokomolekulskih polimera, kao što su temperatura, vreme i brzina mešanja, koncentracija, pH vrednost, stepen deacetilacije (za hitozan) i veličina čestica (za HP GG) [27].

Na osnovu izmerenih vrednosti viskoziteta pri brzini smicanja u opsegu $10\text{--}100\text{ s}^{-1}$, može se uočiti da je viskozitet vehikuluma V12 ($49,25\text{ mPa}\cdot\text{s}$, pri 100 s^{-1}) koji sadrži kombinaciju HP 40 GG i MMW CS značajno veći od zbira viskoziteta ($7,4\text{ mPa}\cdot\text{s}$ i $6,8\text{ mPa}\cdot\text{s}$, pri 100 s^{-1} , redom) vehikuluma koji sadrže pojedinačno ove polimera, te da je došlo do ispoljavanja sinergističkog efekta između HP 40 GG i MMW CS koji se odrazio na povećanje viskoziteta. Dobijena vrednost viskoziteta našla se u opsegu, preporučenom za oftalmološke preparate ($15\text{--}50\text{ mPa}\cdot\text{s}$) i može se očekivati da će ovaj vehikulum biti otporniji na aktivnosti drenažnog sistema i pokazati duže zadržavanje na površini oka, te da će se u isto vreme dobro podnositi na oku [29].

U vehikulumu V11, u čijem sastavu se pored HP 40 GG umesto MMW CS nalazi HEC, u istoj koncentraciji (0,5%, m/V) viskozitet je bio $59,5\text{ mPa}\cdot\text{s}$, odnosno viši nego u slučaju vehikuluma V12, te se može zaključiti da je HEC više doprinela ukupnom viskozitetu nego kada je MMW CS korišćen u kombinaciji sa HP 40 GG. Uporedo, slična pojava uočena je i kod vehikuluma koji sadrži kombinaciju HP 40 GG i NH (V14) čiji je viskozitet iznosio $73,1\text{ mPa}\cdot\text{s}/100\text{ s}^{-1}$, dok su vehikulumi sa pojedinačnim polimerima HP 40 GG, odnosno NH imali viskozitete $7,4\text{ mPa}\cdot\text{s}$, odnosno $3,7\text{ mPa}\cdot\text{s}$, redom, pri istoj brzini smicanja. Izrazito visok viskozitet, koji se nalazi daleko izvan intervala preporučenog viskoziteta za oftalmološke preparate ($130,5\text{ mPa}\cdot\text{s}/100\text{ s}^{-1}$), pokazuje vehikulum V2 u kojem su kombinovana dva derivata celuloze, HPMC i HEC, te ovaj vehikulum, nakon reološke studije, više nije bio predmet istraživanja.

Kod većine vehikuluma došlo je do značajnog smanjenja vrednosti prividnog viskoziteta nakon što je dodata VST u odnosu 40:7. Odnos količine vehikuluma i VST baziran je na činjenici da prilikom otkapavanja kapi iz kapaljke postavljene na bočicu za kapi za oči, prosečni volumen jedne kapi iznosi prosečno oko $40\text{ }\mu\text{l}$, dok sa druge strane volumen suzne tečnosti u normalnim fiziološkim uslovima iznosi oko $7\text{ }\mu\text{l}$ [155, 156]. Bez obzira na nezatno razblaženje VST, viskozitet pojedinih vehikuluma snizio se i do 4 puta (V1 i V3) što je bio još jedan od razloga za isključivanje navedenih vehikuluma iz daljih ispitivanja, dok je kod vehikuluma V4 došlo da nezatnog smanjenja viskoziteta.

Nasuprot tome, kod vehikuluma V7 (HP 40 GG; 0,25%, m/V) i V13 (NH; 0,4%, m/V) sa razblaženjem i zagrevanjem na temperaturu površine oka, došlo je do značajnog povećanja prividnog viskoziteta koje se kod vehikuluma V7 može uočiti kako na nižim, tako i na višim brzinama smicanja (tabela 4.2).

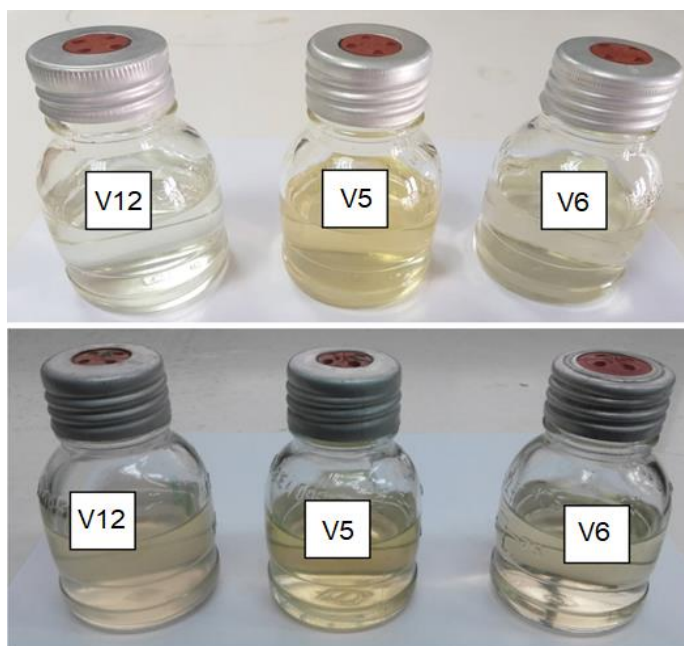
Slično ponašanje zabeleženo je i kod komercijalnih preparata SU i Pro (tabela 4.3) koji sadrže navedene polimere. Nadalje, statistička analiza je pokazala da je kod vehikuluma V7 i V13 došlo do statistički značajnog povećanja viskoziteta nakon razblaženja ($p < 0,05$), dok povećanje viskoziteta kod komercijalnih preparata nije imalo statističku značajnost ($p > 0,05$). Kod komercijalnog proizvoda SU, koji je puferovan boratom uz dodatak sorbitola (tabela 3.3), nakon primene i mešanja sa suznom tečnošću pri fiziološkim uslovima (pH 7,4), dolazi do umrežavanja borata i derivata guar gume što dovodi do obrazovanja mekog gela i blagog povećanja viskoziteta [57, 79]. Sličan efekat je postignut primenom dvobaznog natrijum-fosfata kao puferske komponente i natrijum-hlorida kao sredstva za izotonizaciju koji su korišćeni za postizanje odgovarajućih fizičko-hemijskih karakteristika vehikuluma koji su predmet istraživanja. Odabrane pomoćne supstance su vrlo lako rastvorljive u prečišćenoj vodi, na sobnoj temperaturi, što značajno doprinosi jednostavnosti i brzini izrade. Drugi ispitivani komercijalni preparat koji u svom sastavu takođe ima derivat guar gume, gel kapi za oči (SGD) pokazao je značajan pad viskoziteta nakon razblaženja i zagrevanja i slično reološko ponašanje kao vehikulum V9 (HP GG; 1%, m/V).

U slučaju komercijalnog preparata koji sadrži HPMC (HD), nakon razblaživanja i zagrevanja, došlo je do značajnog pada viskoziteta već pri nižim brzinama smicanja (tabela 4.3).

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj fazi, iz dodatnih ispitivanja isključeni su vehikulumi V1, V2, V3, V4, V8, V9 i V10.

4.1.3.2 Ispitivanje uticaja sterilizacije parom i perioda čuvanja od 28 dana na fizičko-hemijske karakteristike odabranih vehikuluma

Sterilizacija u autoklavu, sprovedena prema farmakopejskim zahtevima, nije uticala na izgled i bistrinu vehikuluma izuzev onih koji su u svom sastavu imali MMW CS (slika 4.6) kod kojih je došlo do promene boje i blagog zamućenja. pH vrednost svih sterilisanih uzoraka nalazila se u opsegu $\pm 0,2$ u odnosu na početne vrednosti, izmerene naposredno nakon izrade.



Slika 4.6. Izgled vehikuluma koji sadrže MMW CS pre (gore) i posle (dole) sterilizacije u autoklavu

Vrednosti prividnih viskoziteta nakon sterilizacije u autoklavu ispitivanih vehikuluma pri različitim brzinama smicanja, prikazani su u tabeli 4.4. Sterilizacija parom dovela je do statistički značajnih promena viskoziteta kod svih ispitivanih vehikuluma ($p < 0,05$), ali se viskozitet vehikuluma V6, V7, V11 i V13 i dalje našao u preporučenom opsegu za oftalmološke preparate. Kod većine vehikuluma došlo je do smanjenja viskoziteta, dok je kod vehikuluma, koji su na početku sterilizacije imali niže viskozitete, došlo do porasta viskoziteta prilikom procesa sterilizacije (V6, V7 i V13) (tabela 4.4). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama [157, 158] koje su pokazale da sterilizacija parom značajno utiče na rastvore hitozana, naročito na njihov viskozitet i molekulsku masu polimera. Toplota stimuliše unakrsno vezivanje polimernih lanaca i samim tim dovodi do precipitacije hitozana.

Takođe, u literaturi postoje podaci da toplota tokom sterilizacije dovodi do promena u prividnom viskozitetu i vremenski zavisnom proticanju i kod rastvora HEC, verovatno zbog hidrolize glikozidnih veza [159], što je takođe u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Tabela 4.4. Vrednosti prividnih viskoziteta merenih nakon procesa sterilizacije pri različitim brzinama smicanja

Viskozitet (mPa·s)*	V5	V6	V7	V11	V12	V13	V14
25 s ⁻¹ (20 °C)	72,7	77,3	64,9	20,7	72,7	82,5	82,9
50 s ⁻¹ (20 °C)	29,3	37,9	39,3	42,5	34,9	40,9	38,5
75 s ⁻¹ (20 °C)	5,5	28,8	26,4	41,8	12,2	27,1	21,2
100 s ⁻¹ (20 °C)	10,6 [#]	15,0 [#]	19,9 [#]	42,1 [#]	4,9 [#]	20,1 [#]	3,3 [#]

*prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%

[#]p < 0,05 u poređenju sa početnim vrednostima

Tabela 4.5. Vrednosti prividnih viskoziteta merenih nakon perioda od 28 dana čuvanja pri ambijentalnim uslovima, pri različitim brzinama smicanja

Viskozitet (mPa·s)*	V5	V6	V7	V11	V12	V13	V14
25 s ⁻¹ (20 °C)	76,8	83,3	43,0	25,2	76,8	75,5	65,5
50 s ⁻¹ (20 °C)	38,2	42,1	20,2	36,3	38,8	37,7	61,6
75 s ⁻¹ (20 °C)	6,5	26,9	3,4	44,8	23,7	17,7	64,2
100 s ⁻¹ (20 °C)	5,2 [#]	20,6 [#]	2,5 [#]	44,6 [#]	19,2 [#]	5,1	65,4 [#]

*prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%

[#]p < 0,05 u poređenju sa početnim vrednostima

Nakon procesa autoklaviranja, prividni viskoziteti vehikuluma koji sadrže HP 40 GG, značajno su se promenili. U literaturi se navodi da guar guma ispoljava reverzibilno smanjenje viskoziteta nakon izlaganja temperaturi [159]. Međutim, kod ispitivnih uzoraka koji sadrže HP 40 GG (V7, V11, V12 i V14) nije uočeno navedeno ponašanje. Dobijeni rezultati ukazuju da sterilizacija parom dovodi do značajnih promena fizičko-hemijskih karakteristika HP 40 GG, naročito njenog viskoziteta. Bez obzira na značajne promene u vrednostima prividnog viskoziteta (p < 0,05) pri različitim brzinama smicanja, svi vehikulumi su zadržali vremenski zavisno proticanje (engl. *shear thinning*). Može se uočiti da je do najznačajnijeg smanjenja prividnog viskoziteta (pri 100 s⁻¹) došlo kod vehikuluma V12 (0,5% MMW CS i 0,25% HP 40 GG) i V14 (0,4% NH i 0,25% HP 40 GG) što ukazuje na to da sterilizacija parom nije odgovarajuća metoda sterilizacije jer toplota i zasićena vodena para dovode do promena u strukturi polimera koje rezultuju značajnim padom viskoziteta [157, 159].

Na osnovu dobijenih rezultata, preporuka je da se izrada ovakve vrste oftalmoloških vehikuluma izvodi pod aseptičnim uslovima, unutar komore sa laminarnim protokom vazduha uz korišćenje pomoćnih supstanci odgovarajućeg mikrobiološkog kvaliteta. Generalno, preporuka je da se lekoviti preparati koji ne mogu biti sterilisani toplotnom metodom u finalnoj ambalaži, izrađuju u aseptičnim zonama od samog početka izrade sve do punjenja u ambalažu, uz kombinaciju sa

sterilizacijom filtracijom kroz bakteriološke filtre, kada je to moguće. U tom slučaju neophodno je koristiti polazne supstance odgovarajućeg mikrobiološkog kvaliteta, sterilisane odgovarajućom metodom sterilizacije [43, 160, 161].

Nakon 28 dana čuvanja na sobnoj temperaturi, bistrina svih vehikuluma bila je zadovoljavajuća. pH vrednost se nalazila u prihvatljivom opsegu uz neznatne promene (od $\pm 0,2$ jedinice). Kod svih vehikuluma je došlo do smanjenja prividnog viskoziteta, izuzev kod vehikuluma V6 i V13 (tabela 4.5) u odnosu na vrednosti prividnih viskoziteta izmerenih na početku ispitivanja (tabela 4.2). Ako se promena prividnog viskoziteta posmatra u odnosu na vrednosti izmerene nakon sterilizacije parom (tabela 4.4), do smanjenja je došlo kod vehikuluma V5, V7 i V13, dok je kod ostalih vehikuluma izmeren viši viskozitet. Interesantno je da se vehikulum V14 “oporavio” i vratio na gotovo početni prividni viskozitet, što donekle ide u prilog činjenici da HP 40 GG pokazuje reverzibilno smanjenje viskoziteta tokom procesa sterilizacije parom.

4.1.4 Površinski napon

Većina pomoćnih supstanci kao što su konzervansi, solubilizatori i sredstva za podešavanje viskoziteta, ali i neke lekovite supstance kao što su antazolin i tetrakain utiču na površinski napon, uglavnom dovodeći do njegovog snižavanja [2, 13]. Osnovni mehanizam njihovog delovanja na površinski napon jeste delimično rastvaranje lipidnog sloja čime dovode do povećanja površinske aktivnosti i destabilizacije suznog filma [162].

Literaturni podaci pokazuju da HPMC ispoljava izvesnu površinsku aktivnost, dok HEC pokazuje vrlo umereno smanjenje površinskog napona. Kada se koriste supstance koje nemaju uticaja na površinski napon, kao što je HEC, potrebno je razmotriti podešavanje površinskog napona na prihvatljive granice fiziološkog opsega [13].

Merenje površinskog napona sprovedeno je u vehikulumima koji su sadržavali odabrane koncentracije pojedinačnih polimera (MMW CS, HP 40 GG i NH). Kako bi se procenio uticaj upotrebljenog konzervansa BAK (0,01%, m/V) na površinski napon odabranih vehikuluma, određivana je vrednost ovog parametra kod nekonzervisanih i konzervisanih vehikuluma. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Vrednosti površinskog napona ispitivanih odabranih vehikuluma (nekonzervisanih i konzervisanih)

Oznaka vehikuluma	$\sigma \pm SD$ (mN/m) bez BAK*	$\sigma \pm SD$ (mN/m) sa BAK*	Smanjenje σ (%)
V6	50,36 \pm 0,49	36,36 \pm 0,30	27,8
V7	57,92 \pm 0,04	33,05 \pm 0,02	43,0
V13	61,10 \pm 0,20	34,75 \pm 0,04	43,1

*srednja vrednost \pm SD, n = 3

Kod svih ispitivanih uzroka uočeno je smanjenje vrednosti površinskog napona usled dodatka konzervansa. Najznačajnije smanjenje površinskog napona izmereno je kod vehikuluma koji su sadržavali HP 40 GG (V7), odnosno NH (V13) i ove vrednosti površinskog napona su nešto ispod 35 mN/m. Sa druge strane, sniženje površinskog napona kod vehikuluma koji sadrži MMW CS (V6) nakon dodatka konzervansa, je značajno manje u odnosu na sniženje koje je uočeno kod druga dva ispitivana vehikuluma.

U literaturi nema podataka o površinskoj aktivnosti HP GG. Postoje podaci samo za guar gumu za koju se uglavnom navodi da ima umerenu površinsku aktivnost sa postepenim smanjenjem površinskog napona (71,18–52,34 mN/m) sa porastom koncentracije guar gume (0–0,97%, m/m).

Takođe, navodi se da rastvor guar gume koncentracije 0,2% (m/m) na temperaturi od 30 °C ima površinski napon 58,07 mN/m [163]. Na osnovu dobijene vrednosti za vehikulum V7 može se pretpostaviti da se i HP 40 GG ponaša slično guar gumi na međupovršini voda/vazduh jer ova umerena površinska aktivnost potiče od velikog broja galaktoznih jedinica [163].

Površinska aktivnost natrijum-hijaluronata nije detaljno razmatrana u literaturi. Generalno se smatra da biološki polielektrolitni polimeri, kao što je natrijum-hijaluronat, imaju slabo izraženu površinsku aktivnost. Međutim, u studiji koju su sprovedeli Rieberio i sar. [164] pokazana je zavisnost površinskog napona rastvora NH od koncentracije, te se površinski napon rastvora koncentracije u opsegu 0,05%–0,35% (m/V), meren na 34 °C, snizio sa ~65 mN/m do ~50 mN/m, što ukazuje na izvesnu površinsku aktivnost. Kod vehikuluma V13, slično kao i kod vehikuluma V7, u kombinaciji sa prisutnim konzervansom, došlo je do značajnog smanjenja površinskog napona, što ukazuje na međusobni uticaj BAK i NH na površinski napon.

Hitozan, zbog svoje hemijske strukture, nema izraženu površinsku aktivnost; polisaharid je sa katjonskim amino (NH_3^+) i alkoholnim grupama (OH) koji u svojoj strukturi ne poseduje hidrofobne grupe koje bi se adsorbovale na međupovršini vazduh/rastvor. Površinski napon rastvora hitozana u 1% - tnoj sirćetnoj kiselini ne razlikuje se značajno od površinskog napona čistog rastvarača [165]. Površinski napon rastvora niskomolekulskog hitozana (1%, m/V) u sirćetnoj kiselini (0,5%, V/V) (pH 5,06) meren na 25 °C iznosio je ~71,45 mN/m dok je na 34 °C (pH 5,21) izmeren površinski napon bio ~70,26 mN/m, što je bilo vrlo blisko vrednostima površinskog napona vode, merenog na istim temperaturama (71,99 mN/m na 25 °C i 70,52 mN/m na 34 °C). Konstantne vrednosti površinskog napona ukazuju na to da molekuli hitozana nemaju afinitet prema međupovršini vazduh/rastvor, tj. da ne poseduju površinsku aktivnost. Pri navedenim pH vrednostima, koje su bliske i pH vrednostima izrađenih vehikuluma, amino grupe molekula hitozana su protonovane, što hitozanu daje hidrofilni karakter u osnovnim rastvorima [166].

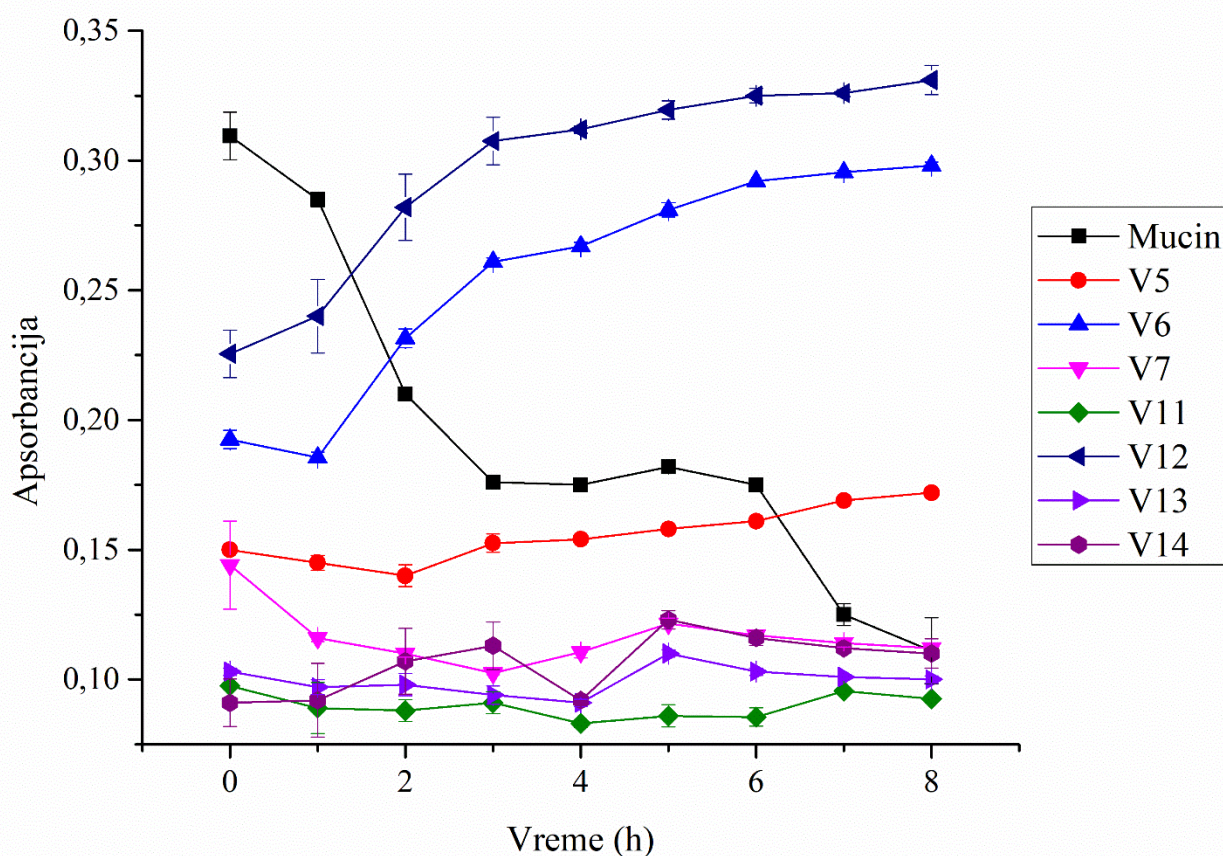
Površinski napon ispitivanih konzervisanih vehikuluma (tabela 4.6) koji je nešto niži od fizioloških vrednosti površinskog napona suzne tečnosti je poželjan, naročito kada je u pitanju terapija sindroma suvog oka jer se ovo stanje povezuje sa višim vrednostima površinskog napona na međupovršini vazduh/suzna tečnost, koji se može kretati u opsegu 44–53 mN/m [167]. Osim toga, kapi za oči nižeg površinskog napona poseduju značajno bolja svojstva vlaženja oka, lako se mešaju sa sastojcima suznog filma i dobro rasprostiru po površini rožnjače što za posledicu ima duže zadržavanje u prekornealnom području i samim tim duži i izraženiji terapijski efekat [168, 169].

4.1.5 Ispitivanje mukoadezivnih karakteristika

Ispitivanja mukoadezivnih svojstava formulisanih vehikuluma (V5, V6, V7, V11, V12, V13 i V14) izvršena su u cilju procene afiniteta vehikuluma za mucin na površini oka. U ispitivanjima je korišćen želudačni mucin svinje zbog svoje sličnosti sa okularnim mucinom koji komercijalno nije dostupan [49].

4.1.5.1 Turbidimetrijska metoda

Promene vrednosti apsorbancije ispitivanih vehikuluma u toku inkubacije sa disperzijom mucina koncentracije 0,1 % (m/V) prikazane su na slici 4.7.



Slika 4.7. Vrednosti apsorbancija izmerenih za smeše vehikuluma i disperzije mucina u toku 8 h (srednja vrednost \pm SD, n = 3)

Turbiditet smeše disperzije mucina i vehikuluma V6 i V12 povećavao se sa vremenom i na kraju eksperimenta bio je znatno viši od turbiditeta same disperzije mucina. Porast turbiditeta u slučaju navedenih vehikuluma ukazuje na međusobnu interakciju MMW CS prisutnog u sastavu vehikuluma i mucina. Naime, pozitivno naelektrisane amino grupe MMW CS, pri neutralnoj pH vrednosti, stupaju u reakciju sa negativno naelektrisanim ostacima sijalinske kiseline prisutnim u sastavu mucina, što rezultuje pojavom taloženja koja se ogleda u povećanju turbiditeta, odnosno u zamućenosti smeše vehikuluma i disperzije mucina [103, 104].

Turbiditet smeše disperzije mucina i vehikuluma V5 se blago povećavao tokom vremena. Međutim, apsorbancije u ovoj smeši su od samog početka znatno niže od onih izmerenih za čistu disperziju mucina, što ukazuje na izostanak interakcije, odnosno da je interakcija MMW CS sa mucinom znatno izraženija kada se nalazi u nižoj koncentraciji. Toj činjenici u prilog idu i ranije objavljeni podaci koji ukazuju na značaj optimalne koncentracije hitozana potrebne kako bi se postigla odgovarajuća mukadhezivna svojstva [170]. U visoko koncentrovanim sistemima, izvan opsega optimalne koncentracije, jačina adhezije značajno slabi. U koncentrovanim rastvorima, koloidne molekule su slabije rastvorljive i manje dostupne za interpenetraciju [170, 171].

Nasuprot tome, u samoj disperziji mucina ili smešama ostalih vehikuluma i disperzije mucina dolazi do smanjenja turbiditeta usled izostanka međusobne interakcije polimera sa mucinom i konstatnog mešanja tokom vremena. Turbiditet smeše disperzije mucina i vehikuluma koji sadrže HP 40 GG (V7) niži je od turbiditeta same disperzije mucina u istom periodu, što može ukazati na izostanak interakcije između mucina i ovog polimera. Pored toga, vehikulum koji sadrži kombinaciju HP 40 GG sa MMW CS (V12) pokazao je značajno viši turbiditet nakon inkubacije sa disperzijom mucina u odnosu na vehikulum u kojem je HP 40 GG u istim koncentracijama kombinovana sa HEC

(V11). Zapravo, na kraju ispitivanja turbiditet je bio najviši upravo u smeši disperzije mucina i vehikuluma V12 (HP 40 GG i MMW CS) ukazujući na najizraženiju interakciju sa mucinom. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da HP 40 GG, kao lubrikantni polimer koji značajno dovodi do povećanja viskoziteta pokazuje bolji sinergistički efekat sa MMW CS u pogledu izraženijih mukoadhezivnih svojstava. Takođe, ovim je potvrđen podatak da nejonski celulozni etri imaju slabo izražena mukoadhezivna svojstva [10].

Turbiditet smeše disperzije mucina i vehikuluma V13 i V14 niži je od turbiditeta same disperzije mucina (slika 4.7). Na osnovu dobijenih rezultata, moglo bi se zaključiti da polimeri koji ulaze u sastav ovih vehikuluma (NH i HP 40 GG) ne pokazuju afinitet prema mucinu. Međutim, literaturni podaci ukazuju na dobro izražen mukoadhezivni karakter NH [49]. Ovaj rezultat samo ukazuje na značaj izbora odgovarajuće metode za procenu mukoadhezivnih karakteristika u zavisnosti od tipa interakcije između polimera i mucina [100].

4.1.5.2 Metoda zasnovana na promenama zeta potencijala

Druga odabrana metoda procene mukoadhezivnih svojstava zasniva se na promeni zeta potencijala čestica mucina, nakon mešanja sa izrađenim vehikulumima. Vezivanje polimera prouzrokuje promene površinskih svojstava čestica mucina što za posledicu ima promene u zeta potencijalu [140, 172].

Ovom ispitivanju podvrgnuti su vehikulumi za koje se na osnovu literaturnih podataka očekivalo da će posedovati izraženu mukoadhezivnost [24, 29] i na osnovu rezultata dobijenih primenom turbidimetrijske metode.

Vrednost zeta potencijala disperzije mucina iznosila je $-7,8 \pm 0,8$ mV (tabela 4.7). Negativno naelektrisanje čestica mucina može se objasniti prisustvom ostataka sijalinske kiseline, tj. oligosahardinih lanaca u čijem sastavu se nalazi veliki broj karboksilnih i sulfatnih grupa [173]. Nakon mešanja disperzije mucina sa vehikulumima V6 (MMW CS) i V12 (MMW CS i HP 40 GG), zeta potencijal je iz negativnih prešao u pozitivne vrednosti zbog prisustva protonovanih amino grupa MMW CS [172]. Ovi rezultati ukazuju na pojavu elektrostatičkih interakcija mucina i MMW CS prisutnog u vehikulumima V6 i V12.

Nasuprot tome, dodavanje vehikuluma (V11) u disperziju mucina dovelo je do veoma blagog snižavanja zeta potencijala, što ukazuje na to da je kombinacija polimera HP 40 GG i HEC imala zanemariv uticaj na zeta potencijal čestica mucina, pre svega zbog njihove nejonske prirode [174].

U slučaju dodavanja vehikuluma V13 (NH) u disperziju mucina, negativna vrednost zeta potencijal je značajno porasla i ovaj porast zeta potencijala može se objasniti anjonskom prirodom NH i prisustvom velikog broja karboksilnih grupa u strukturi ovog polimera.

Sa druge strane, nakon dodataka vehikuluma V14 (NH i HP 40 GG), zeta potencijal je bio u blagom porastu u odnosu na samu disperziju mucina.

Tabela 4.7. Vrednosti zeta potencijala disperzije mucina i smeša disperzije mucina sa ispitivanim vehikuluma

Oznaka vehikulum	Polimer(i) u sastavu vehikuluma (koncentracija)	Zeta potencijal (mV)*
Mucin	-	-7,8 ± 0,8
V6	MMW CS (0,5%)	21 ± 0,5
V11	HP GG/HEC (0,25%/0,5%)	-8,7 ± 1,8
V12	HP GG/MMW CS (0,25%/0,5%)	16,5 ± 1,1
V13	NH (0,4%)	-25 ± 0,2
V14	HP GG/NH (0,25%/0,4%)	-0,41 ± 0,2

*srednja vrednost ± SD, n = 3

S obzirom na primarni mehanizam interakcije MMW sa mucinom koji se zasniva na elektrostatičkim interakcijama između pozitivno naelektrisanih amino grupa i negativno naelektrisanih ostataka sijalinske kiseline, metoda zasnivana na promeni zeta potencijala adekvatna je za primenu kod uzoraka koji sadrže pozitivno naelektrisane polimere, kakav je MMW CS. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je najizraženija interakcija zabeležena između vehikuluma V6 i mucina sa promenom zeta potencijala za čak ~4 puta, a nakon toga vehikuluma V12 i mucina gde je došlo do porasta zeta potencijala za ~3 puta.

4.1.5.3 Kontinualna i oscilatorna reološka analiza smeša vehikuluma i mucina

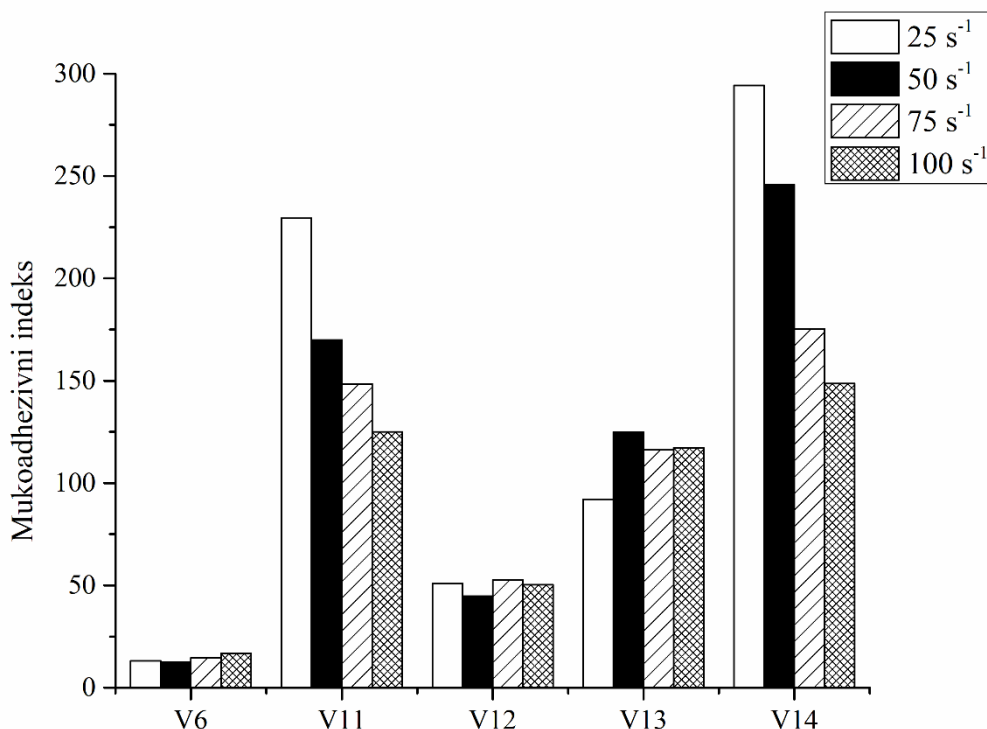
Jedna od najčešće korišćenih metoda za procenu mukoadhezivnih karakteristika polimera, zasniva se na utvrđivanju polimer-mucin interakcije merenjem promene viskoziteta u okviru kontinualne reološke analize, koja se javlja kao posledica njihovog sinergističkog efekta. Dodatno, pored merenja viskoziteta, viskoelastična oscilatorna merenja mogu da ukažu na tip interakcije mukoadhezivnog polimera i mucina [175].

U slučaju mukoadhezivnih polimera viskozitet smeše disperzije mucina i vehikuluma ($\eta_{\text{smeša}}$) ima višu vrednost od zbira pojedinačnih viskoziteta ($\eta_{\text{polimer}} + \eta_{\text{mucin}}$) usled interakcija do kojih dolazi između polimera i mucina i u tom slučaju dobija se pozitivna vrednost mukoadhezivnog indeksa [105, 176]. U slučaju kada mukoadhezivni indeks raste sa porastom brzine smicanja, to ukazuje na to da je međusobna interakcija polimera i mucina izraženija pri višim brzinama smicanja. Ovaj fenomen se takođe može objasniti snažnije izraženim pseudoplastičnim karakterom polimernih vehikuluma u odnosu na smeše sa disperzijom mucina [141]. Pseudoplastično ponašanje kod oftalmoloških vehikuluma se smatra veoma poželjnim jer obezbeđuje adheziju za mukoznu površinu čak i pri visokim brzinama smicanja koje se javljaju tokom treptanja.

Na slici 4.8 prikazane su promene vrednosti mukoadhezivnog indeksa u zavisnosti od brzine smicanja. Kod vehikuluma kod kojih dolazi do smanjenja vrednosti mukoadhezivnog indeksa sa povećanjem brzine smicanja (V11 i V14), može se zaključiti da je interakcija sa mucinom izraženija u periodima mirovanja između treptanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa sličnim studijama u kojima su ispitivana mukoadhezivna svojstva same hijaluronske kiseline u kapima za oči [49, 173]. Mukoadhezivni indeksi izračunati na ovaj način nalaze se pod direktnim uticajem viskoziteta, tj. koncentracije i molekulske mase polimera [49].

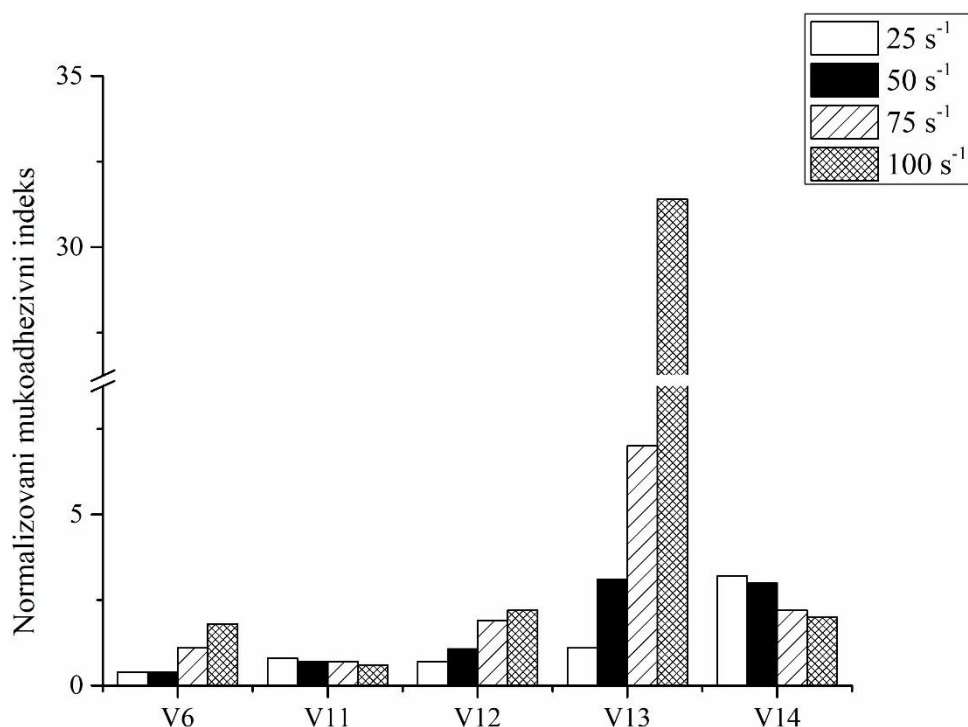
Daleko najvišu vrednost mukoadhezivnog indeksa pokazuje vehikulum V14, a potom V11, pri svim brzinama smicanja. Kombinacije vehikuluma V13 i V14 sa disperzijom mucina pokazale su

izrazito više viskozitete (173 mPa·s, odnosno 274 mPa·s, pri 100 s^{-1}) u odnosu na zbir vrednosti viskoziteta vehikuluma i disperzije mucina (55,9 odnosno 125,4 mPa·s, pri 100 s^{-1}), što ukazuje na pojavu reološkog sinergizma i međusobnu interakciju polimera i mucina.



Slika 4.8. Vrednosti mukoadhezivnog indeksa ispitivanih uzoraka pri različitim brzinama smicanja

Primena rezultata reološke karakterizacije za procenu mukoadhezivnosti ima i određena ograničenja, jer se ovako dobijeni rezultati nalaze pod uticajem koncentracije upotrebljenog polimera, viskoziteta polimernog rastvora, tipa mucina i njegove koncentracije, pH vrednosti i vrste medijuma [141]. U toku ovog ispitivanja, uslovi kao što su koncentracija polimera, tip i koncentracija mucina, pH i vrsta medijuma su bili nepromenjeni, izuzev viskoziteta vehikuluma. U cilju dobijanja rezultata koji su međusobno uporedivi, izračunat je i parametar normalizovani mukoadhezivni indeks, odnosno „normalizovani reološki sinergizam“ koji je ranije opisan u literaturi [141]. Izračunate vrednosti normalizovanog mukoadhezivnog indeksa pri različitim brzinama smicanja prikazane su na slici 4.9. Pored toga, smatra se da ako sposobnost kvašenja i rasprostiranja imaju glavnu ulogu u povezivanju sa mucinom, umesto međusobne interpenetracije lanaca polimera i glikoproteina, druge tehnike, kao što su merenje ugla kvašenja će bolje predvideti dešavanja u *in vivo* uslovima [175].

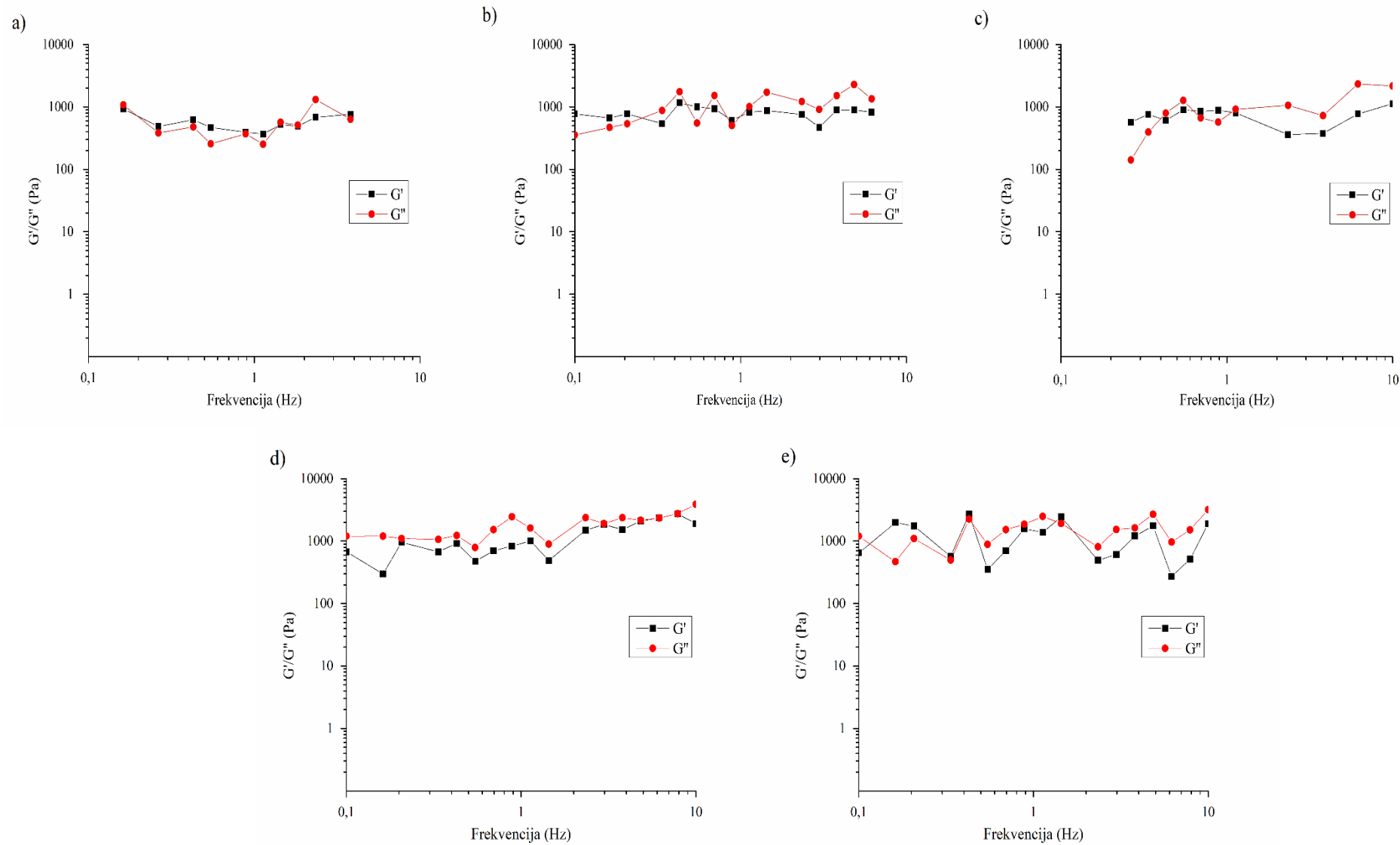


Slika 4.9. Vrednosti normalizovanog mukoadhezivnog indeksa pri različitim brzinama smicanja

Više vrednosti ovog parametara su dobijene kod vehikuluma u kojem je HP 40 GG bila u kombinaciji sa MMW CS (V12) nego sa HEC (V11), što je u skladu i sa rezultatima dobijenim turbidimetrijskom metodom i ukazuje da dodatak HP 40 GG zaista poboljšava mukoadhezivna svojstva MMW CS i da je to moguće utvrditi primenom navedenih metoda.

Na osnovu svih do sada prikazanih rezultata reološke analize pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima i procene mukadhezivnih karakteristika, može se pretpostaviti da će formulacije V12 i V14 pokazati odgovarajuće karakteristike zahvaljujući kombinaciji polimera pogodnih fizičko-hemijskih i funkcionalnih osobina (viskozitet i mukoadhezivnost). Sve navedeno u *in vivo* sredini može doprineti značajnom produženju vremena zadržavanja, lubrikantnom efektu i vlaženju površine oka. Povećanjem viskoziteta suznog filma, usled prisustva HP 40 GG u formulaciji, produžava se kontakt i pospešuje interakcija NH, odnosno pozitivno naelektrisanog MMW CS sa negativno naelektrisanim mucinom [174].

U cilju procene tipa interakcije u smeši polimer-mucin, sprovedena je oscilatorna reološka analiza. Primenom konstantne deformacije u opsegu frekvencija 0,1–10 Hz (engl. *frequency sweep*), moguće je proceniti koji tip interakcije preovladava u smeši polimer-mucin. Rezultati oscilatornih merenja smeša vehikuluma i disperzije mucina (označenih kao V6M, V11M, V12M, V13M i V14M) prikazani su na slici 4.10. Mehanizam interakcija polimera i mucina može biti baziran na jonskoj interakciji, fizičkom preplitanju, van der Waals-ovim silama i obrazovanju vodoničnih veza [10]. Relativne magnitude elastičnog (G') i viskoznog (G'') modula mogu ukazati na kvalitativne karakteristike struktura u smeši. U rastvorima koji sadrže visokomolekulske polimere, moguća su tri različita slučaja: $G' \gg G''$ za hemijski umrežene sisteme, $G' > G''$ za sisteme koji su povezani sekundarnim vezama, $G' \leq G''$ za fizički umrežene polimerne sisteme [177]. Dobijeni rezultati (slika 4.10) ukazuju na fizičko preplitanje polimernih lanaca i glikoproteinskih lanaca mucina i stvaranje slabih vodoničnih veza između ukrštenih lanaca, jer je $G' \leq G''$, kod svih ispitivnih uzoraka. Ukrštanje G' i G'' u regionu nižih frekvencija, potvrdilo je strukturno ponašanje unutar smeše [177].



Slika 4.10. Zavisnost elastičnog (G') i viskoznog (G'') modula od frekvencije za smeše: a) V6M, b) V11M, c) V12M, d) V13M i e) V14M

Parametar koji se izračunava iz odnosa viskoznog (G'') i elastičnog (G') modula naziva se faktor gubitka (engl. *loss factor or damping factor*) ili tangens faznog ugla ($\tan \delta$). Viskoelastičnost je svojstvo materijala da ispoljava i viskozna i elastična svojstva, pod uticajem deformacije. Viskoelastične tečnosti imaju fazni ugao jednak ili veći od 90° i ispoljavaju veću vrednost viskoznog (G'') u odnosu na elastični (G') moduo ($\tan \delta > 1$). Nasuprot tome, gelovi kao čvrsti viskoelastični materijali, pokazuju veće vrednosti elastičnog (G') u odnosu na viskozni (G'') modul ($\tan \delta < 1$) i pokazuju vremenski zavisani, odložen odgovor, bilo da je primena stresa ili deformacije u toku ili nakon njihovog završetka [178].

Vrednost parametra tangensa faznog ugla ($\tan \delta$) razmatrana je u funkciji konstantne deformacije pri frekvenciji 1,13 Hz (tabela 4.8). Dobijene vrednosti $\tan \delta$ za ispitivane smeše ukazuju na dominantnije elastično ponašanje smeše V6 i mucina, a sa druge strane više viskozno za ostale smeše, što verovatno ima za posledicu efikasniju interakciju između polimera i mucina.

Tabela 4.8. Vrednosti reoloških parametara G' , G'' i $\tan \delta$ određenih u smešama mucin-ispitivani vehikulum

Oznaka smeše	G' [Pa]	G'' [Pa]	$\tan \delta$
V6M	367	253	0,69
V11M	826	1010	1,22
V12M	806	917	1,14
V13M	1007,5	1615	1,60
V14M	1381,5	2487	1,80

4.2 REZULTATI DRUGE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

4.2.1 Izrada i fizičko-hemijska karakterizacija kapi za oči sa model lekovitim supstancama

Za izradu kapi za oči sa model lekovitim supstancama, na osnovu dobijenih rezultata iz prve faze eksperimentalnog rada, odabrani su vehikulumi koji sadrže pojedinačne polimere V6 (MMW CS), V7 (HP GG), V13 (NH) i oni u kojima je HP GG kombinovana sa MMW CS (V12) i sa NH (V14).

Dodatno, na početku ove faze izvršena je uporedna fizičko-hemijska karakterizacija vehikuluma V7 i V7a sa dva različita uzorka hidroksipropil guar gume, različitog stepena molarne supstitucije (tabela 4.9).

Tabela 4.9. Rezultati fizičko-hemijske karakterizacije vehikuluma sa različitim uzorcima hidroksipropil guar gume

Osobine polimera	Oznake uzoraka	
	V7 (HP 40 GG)	V7a (HP GG)
Viskozitet (1%) nakon 2 h*	5200 mPa·s	2500-4500 mPa·a
pH (1%)*	10	9,0–11,0
Stepen molarne supstitucije*	0,4	0,6
Mr (određena eksperimentalno)	261,7 ± 38,1 kDa	110 ± 7,5 kDa
pH (0,33%) pre podešavanja na 5,5	7,2	8,0
Transparencija	88,9%	97,5%
Osmolalnost (mOsm/kg) (0,25%)	283	277
Viskozitet (0,25%) (20 °C, 100 s ⁻¹)	20,1 ± 0,5 mPa·a	20,8 ± 0,6 mPa·a

*prema specifikaciji proizvođača

Viskoziteti oba izrađena vehikuluma imali su približno iste vrednosti, međutim zbog bolje transparencije, u nastavku rada, za izradu kapi za oči sa lekovitim supstancama odabran je vehikulum V7a.

U okviru ove eksperimentalne faze izrađene su kapi za oči sa aktivnim supstancama (OLO i KF) i navedenih pet vehikuluma.

Sastav i oznake navedenih formulacija kapi za oči, kao i rezultati njihove fizičko-hemijske karakterizacije sprovedene 24 h nakon izrade, prikazani su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Sastav kapi za oči sa OLO i KF i rezultati njihove fizičko-hemijske karakterizacije

Sastav	F1OLO	F2OLO	F3OLO	F4OLO	F5OLO	F1KF	F2KF	F3KF	F4KF	F5KF
	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)	% (m/V)
OLO	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
KF	-	-	-	-	-	0,0345	0,0345	0,0345	0,0345	0,0345
MMW CS	0,5	-	0,5	-	-	0,5	-	0,5	-	-
HP GG	-	0,25	0,25	-	0,25	-	0,25	0,25	-	0,25
NH	-	-	-	0,4	0,4	-	-	-	0,4	0,4
Natrijum-hlorid	0,2	0,6	0,2	0,7	0,7	0,2	0,6	0,2	0,7	0,7
BAK	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Dibazni natrijum-fosfat (anhidrovani)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ciljna pH (HCl/NaOH)	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-6,0
Prečišćena voda	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml	do 100 ml
pH	5,5	6,0	5,5	5,6	5,3	5,0	5,0	5,5	5,4	5,1
Transparencija (%)	98,0	96,7	95,8	100,0	98,4	98,1	97,8	95,6	100,0	98,5
Osmolalnost (mOsm/kg)	227	261	219	359	378	246	302	291	357	385
Viskozitet (mPa·s) na 20 °C*	11,3 ± 2,3	20,1 ± 0,6	51,9 ± 2,0	11,2 ± 0,9	51, ± 0,8	20,1 ± 1,3	20,1 ± 0,4	51,2 ± 2,2	10,9 ± 1,7	54,8 ± 2,2

*Vrednost viskoziteta predstavlja srednju vrednost ± SD (n = 3) pri brzini smicanja od 100 s⁻¹

Sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija sprovedena na vehikulumima, ponovljena je i na formulacijama kapi za oči koje sadrže model lekovite supstance u cilju procene uticaja dodatka leka na karakteristike odabranih viskozničkih vehikuluma.

Sve ispitivane formulacije su na sobnoj temperaturi bile homogene i transparentne viskozne tečnosti (tabela 4.10). Bistrina je jedan od najznačajnijih zahteva za kvalitet oftalmoloških preparata. Kada u sastav oftalmoloških preparata ulaze polimeri za povećanje viskoziteta, bistrina mora biti obezbeđena i praćena tokom perioda ispitivanja stabilnosti [23]. U kapima za oči ne smeju biti prisutne čestice koje mogu da izazovu mehaničku iritaciju oka.

Puferski kapacitet oka je značajno slabiji od puferskog kapaciteta krvi jer nedostaje hemoglobin/oksi-hemoglobin puferski sistem. Sa druge strane, puferski sistem oka uključuje karbonate, fosfate i proteine. Iako je pH vrednost suzne tečnosti, slično kao i krvi, oko 7,4, pri uobičajenoj primeni kapi za oči, smatra se da nepuferovani rastvori čija se pH vrednost nalazi u opsegu 7,3–9,7, ne izazivaju osećaj bola, dok se pH vrednosti u opsegu 5,5–11,4 smatraju prihvatljivim [179].

Sa aspekta dobre podnošljivosti, bilo bi poželjno da su kapi za oči euhidrične (pH 7,4), ali vrlo često to praktično nije izvodljivo. Rastvorljivost, stabilnost lekovite supstance (vrlo često i ekscipijenasa) i optimalna efikasnost imaju primarnu ulogu u odnosu na fiziološki efekat (toleranciju) kod podešavanja odgovarajuće pH vrednosti preparata. Najpoželjnija pH vrednost je ona koja može da zadovolji sve navedene faktore [179]. pH vrednost formulisanih kapi za oči podešena je dodatkom 0,1M HCl ili 0,1M NaOH tako da se nalazi u opsegu 5,0–6,0 iz više razloga.

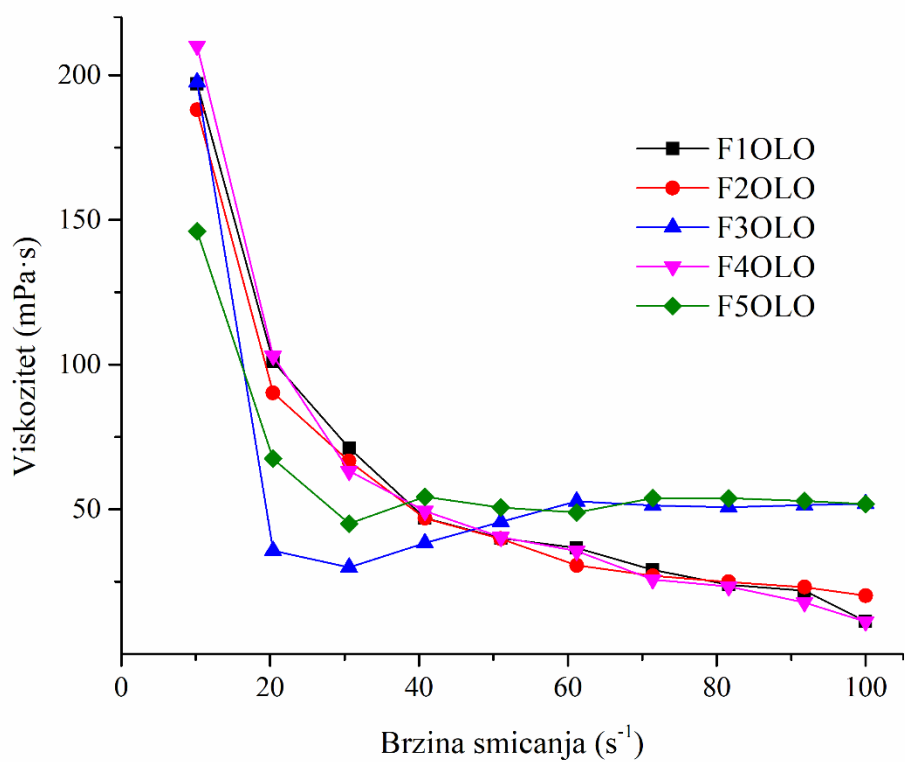
Kao što je ranije navedeno, razlog podešavanja na nešto niže pH vrednosti u odnosu na fiziološke, jeste upotreba MMW CS koji precipitira na pH vrednostima višim od njegove pKa vrednosti (6,2). Pri odabranim pH vrednostima, OLO koji poseduje i kiselu i baznu funkcionalnu grupu, se nalazi u obliku cviterjonske strukture. U području pH vrednosti između pKa1 i pKa2 molekule OLO su elektroneutralne i pokazuje najnižu lipofilnost pri pH vrednostima u opsegu 6,0–7,5 ($\log D = -1,64$) [90]. U studiji optimizacije formulacije *in situ* gela sa OLO, kao pH vrednost optimalne formulacije odabrana je pH 4,7, a ispitivanje tolerancije na oku zečeva pokazalo je da formulacija ne dovodi do iritacije i dobro je podnošljiva [88]. Pored navedenog, pH vrednost komercijalnih kapi za oči sa KF nalazi se u opsegu 4,7–6,0. Rastvorljivost KF kao slabe baze (pKa 8,43) je pH-zavisna i veća je u kiselj sredini, dok u neutralnoj i blago alkalnoj sredini dolazi do njegove precipitacije.

Prosećna osmolalnost suzne tečnosti kod zdravog oka tokom dana iznosi 302 mOsm/kg. Hipotonićni i hipertonićni rastvori izazivaju iritaciju oka i posledićno dovode do povećanog lućenja suza. Normalna vrednost osmotskog pritiska suza ekvivalentna je 0,9%–1,0% rastvoru natrijum-hlorida. Sa aspekta tonićnosti, oko ima prilićno visok nivo tolerancije zbog izrazito malog volumena kapi za oči koji se aplikuje i brzog razblaživanja suznom tećnošću. Rastvori čiji je osmotski pritisak ekvivalentan osmotskom pritisku rastvora natrijum-hlorida koncentracije 0,6–1,3%, se dobro podnose na oku [180]. Za podešavanje tonićnosti formulisanih kapi za oči korišćen je natrijum-hlorid u koncentraciji od 0,2% (m/V) do 0,7% (m/V) i sve formulacije su imale tonićnost koja se našla u prihvatljivom opsegu (tabela 4.10).

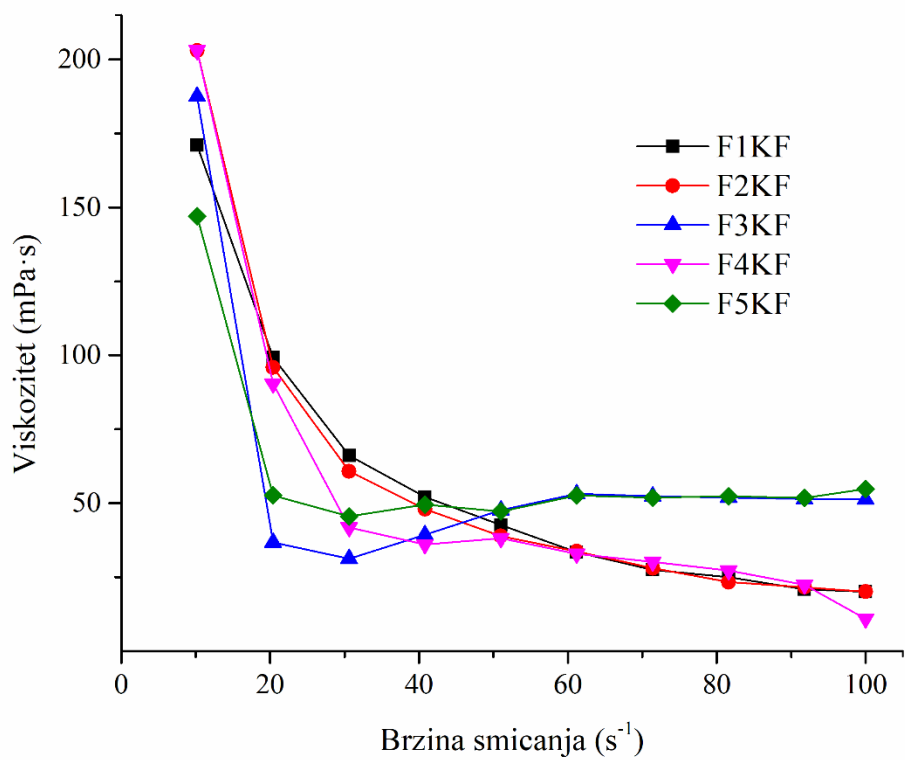
Krive viskoziteta ispitivanih kapi za oči prikazane su na slici 4.11. Znaćaj viskoziteta tećnih oftalmoloških preparata za vreme zadržavanja na površini oka, odupiranje drenaćnom sistemu i poboljšanje okularne raspoloživosti detaljno je obrazložen ranije (napisati broj poglavlja).

Sve ispitivane formulacije su zadržale reološko ponašanje ispitivanih vehikuluma iz 1. faze eksperimentalnog rada, odnosno “*shear thinning*” tip proticanja. Pored toga, ispitivane formulacije pokazuju zadovoljavajući viskozitet, pri nižim brzinama smicanja, odnosno u stanju mirovanja između treptanja, što omogućava bolju otpornost na drenaću/isparavanje i duće vreme zadržavanja [181]. Povećanjem viskoziteta kapi za oči postiže se bolja distribucija lekovite supstance i ovakvi preparati imaju lubrikantni efekat i sprećavaju iritaciju, zbog čega su naroćito znaćajni u okviru terapije keratokonjunktivitisa [179]. Pseudoplastićni karakter ispitivanih kapi za oči doprinosi usporenom uklanjanju lekovitih supstanci iz konjunktivalne vrećice, bez mogućnosti za stvaranje poteškoća prilikom treptanja [182].

a)



b)



Slika 4.11. Krive viskoziteta ispitivanih formulacija kapi za oči sa a) OLO i b) KF

Uzimajući u obzir kombinaciju pozitivnog reološkog ponašanja ispitivanih kapi za oči sa prethodno utvrđenim mukoadhezivnim svojstvima ispitivanih vehikuluma, može se očekivati produženo vreme zadržavanja na površini oka i mogućnost za produženo delovanje lekovitih supstanci.

4.2.2 Ispitivanje potencijalnih interakcija u smeši lekovite supstance i polimera

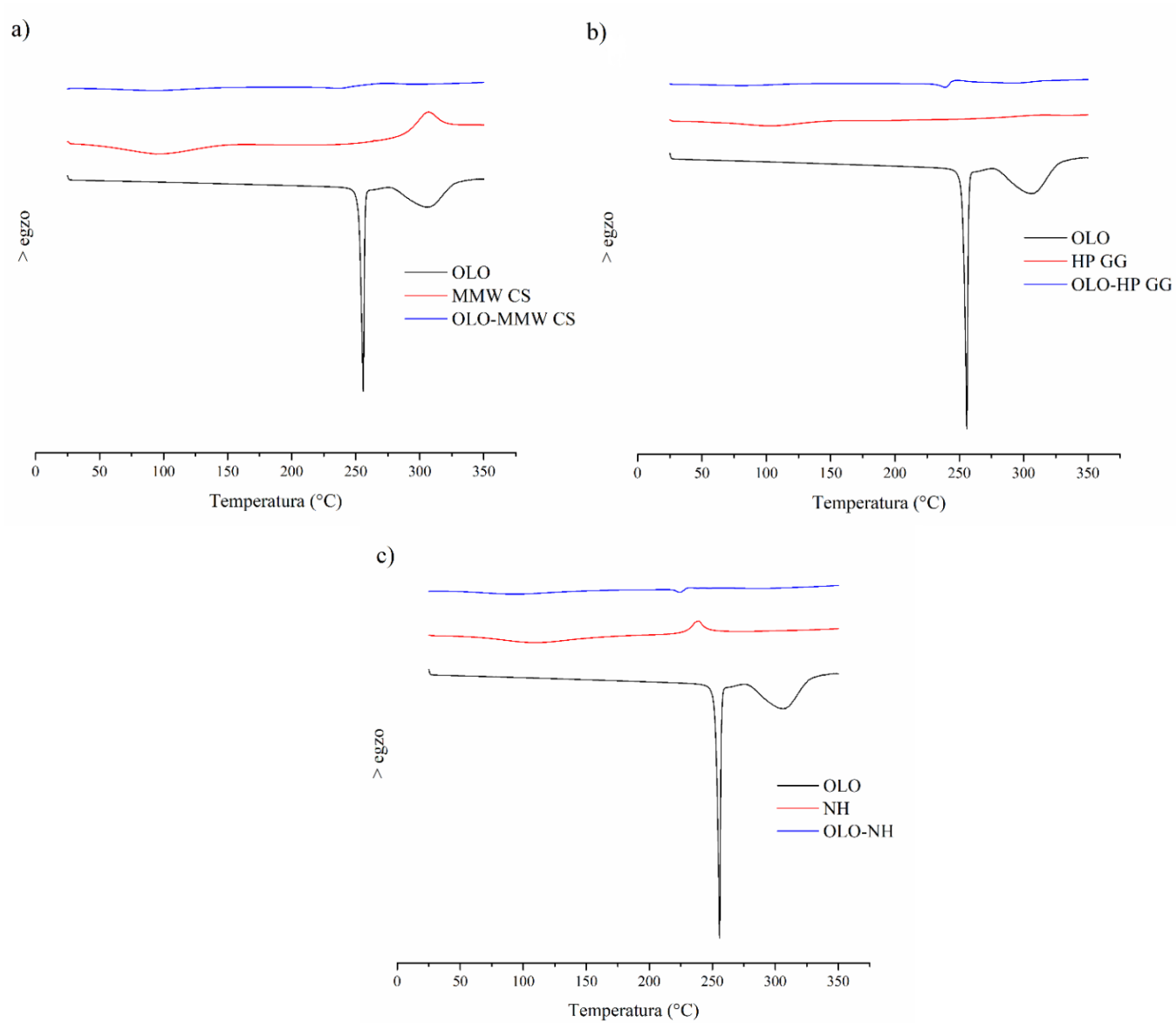
S obzirom da male promene u sastavu rastvora polimera mogu da se odraze na njihove fizičko-hemijske i funkcionalne karakteristike, a posledično i vreme zadržavanja preparata na površini oka, tj. sposobnost odupiranja drenažnom sistemu, značajno je ispitati postojanje potencijalnih interakcija polimera sa dodatim lekovitim supstancama. U cilju procene kompatibilnosti lekovitih supstanci i upotrebljenih polimera, te međusobne kompatibilnosti polimera koji su kombinovani prilikom izrade vehikuluma, izvršeno je poređenje DSC termograma i FT-IR spektara pojedinačnih supstanci (OLO i KF) i fizičkih smeša lekovitih supstanci sa polimerima (MMW CS, HP GG i NH) i fizičkih smeša samih polimera (MMW CS-HP GG i HP GG-NH).

4.2.2.1 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential scanning calorimetry*, DSC)

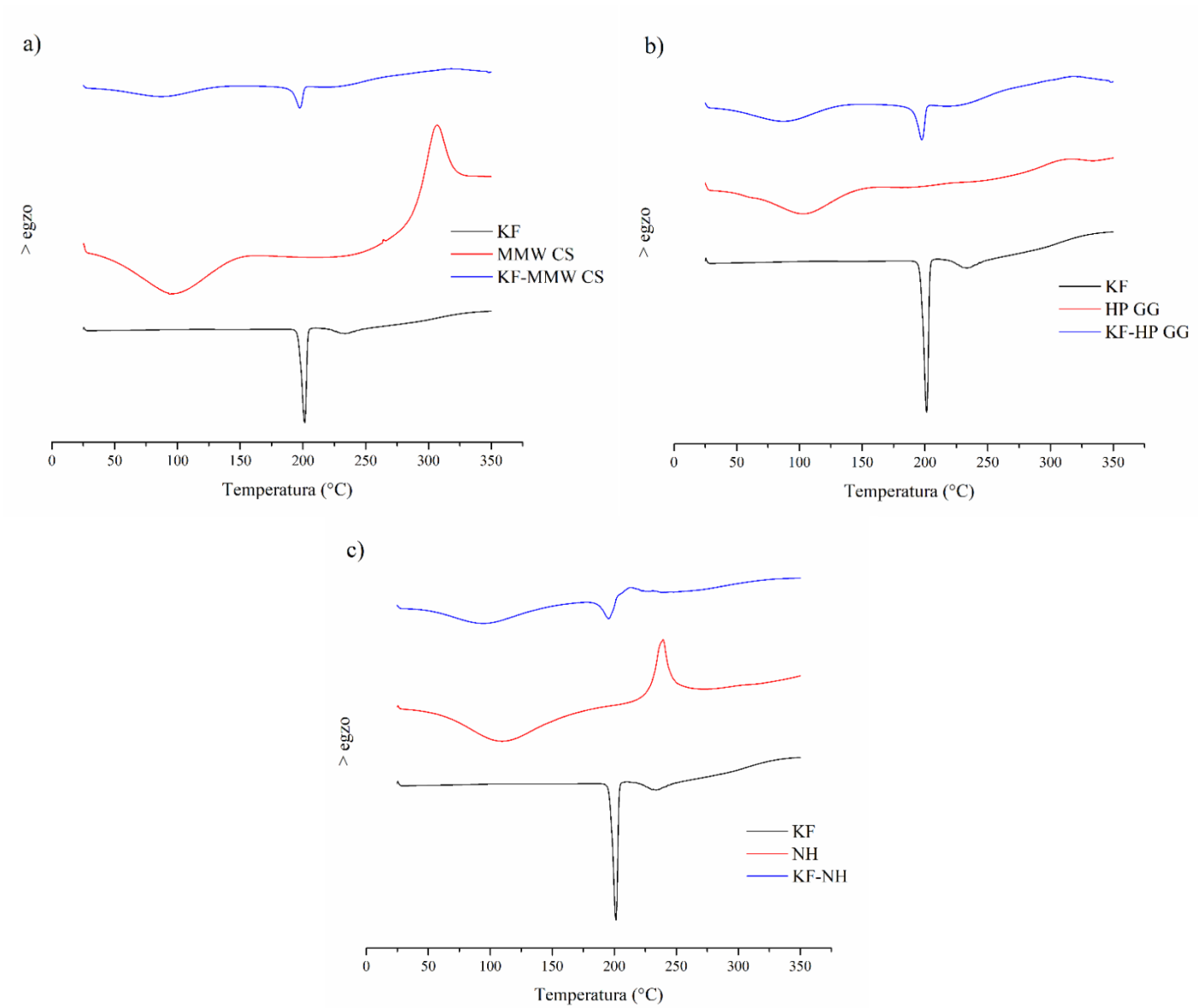
DSC termogrami OLO, KF, korišćenih polimera i njihovih fizičkih smeša, prikazani su na slikama 4.12–4.14.

Na DSC termogramu OLO (slika 4.12), može se uočiti oštar endotermni pik na 255,8 °C koji odgovara tački topljenja OLO [183].

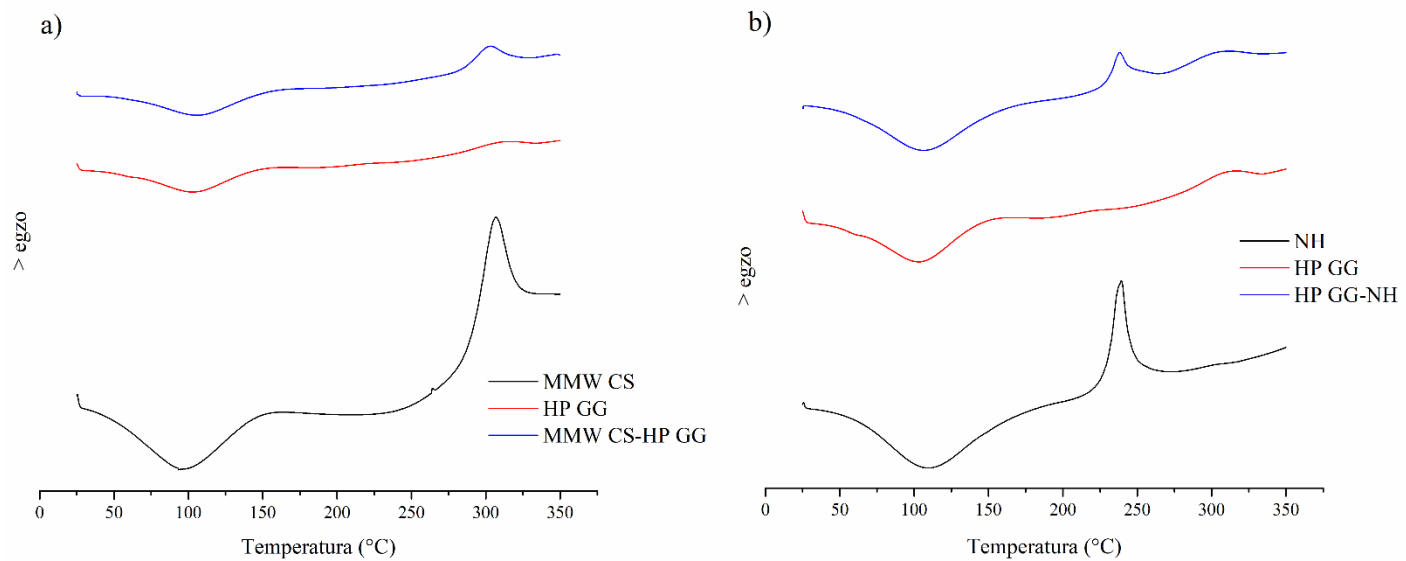
DSC termogram KF (slika 4.13) takođe pokazuje oštar endotermni pik na 201,5 °C što ukazuje na kristalnu prirodu obe supstance [184].



Slika 4.12. DSC krive a) OLO, MMW CS i fizičke smeše (OLO-MMW CS), b) OLO, HP GG i fizičke smeše (OLO-HP GG), c) OLO, NH i fizičke smeše (OLO-NH)



Slika 4.13. DSC krive a) KF, MMW CS i fizičke smeše (KF-MMW CS), b) KF, HP GG i fizičke smeše (KF-HP GG), c) KF, NH i fizičke smeše (KF-NH)



Slika 4.14. DSC krive a) MMW CS, HP GG i fizičke smeše (MMW CS-HP GG), b) NH, HP GG i fizičke smeše (NH-HP GG)

Kriva MMW CS (slika 4.14a) pokazuje jedan širok endotermni pik na 93,5 °C zbog gubitka vode iz hidrofilnih grupa, a potom sledi jedan egzotermni degradacioni proces koji svoj maksimum dostiže pri temperaturi od 306,8 °C [185]. Na krivoj HP GG (slika 4.14), prvi endotermni pik, čiji maksimum se nalazi na 102,8 °C, potiče od gubitka vode, dok se drugi slabije izražen endotermni pik oko 330 °C može povezati sa raskidanjem glikozidnih veza i depolimerizacijom. Dodatni mali egzotermni pik na oko 320 °C koji verovatno potiče od sagorevanja proizvoda degradacije [186]. Na termogramu NH (slika 4.14b) uočava se širi endotermni pik oko 100 °C koji, kao i kod ostalih polimera, predstavlja gubitak vode i jedan egzotermni pik na 239,9 °C koji odgovara termičkoj razgradnji polimera [187]. Odsustvo oštih pikova, karakterističnih za kristalne materijale, u termogramima polimera, te njihovim fizičkim smešama, ukazuje na nekristalnu strukturu [188].

Fizička smeša OLO i MMW CS (slika 4.12a) ispoljava dva endotermna pika sa maksimumima na 93,7 °C i 237,3 °C, što odgovara gubitku vezane vode iz molekula MMW CS i topljenju OLO, uz dodatno jedan egzotermni pik na 274,2 °C. Promena u izgledu i položaju endotermnog pika OLO u fizičkoj smeši OLO-MMW CS, koji je sada raširen i pomeren prema nešto nižim temperaturama, nastaje kao posledica slabih elektrostatičkih interakcija do kojih dolazi između karboksilne grupe OLO i amino grupe MMW CS. Na slici 4.12b, termogramu fizičke smeše OLO-HP GG, izdvajaju se endotermni pikovi čiji se maksimumi nalaze na 80,3 °C i 238,8 °C i jedan egzotermni pik na 248,7 °C. Slično ponašanje se može uočiti i na termogramu fizičke smeše OLO i NH (slika 4.12c) na kom je široki endotermni pik na oko 100 °C koji odgovara gubitku vode iz NH, dok endotermni pik koji potiče od topljenja OLO je sada pomeren na 224,3 °C. Pomeranje i širenje endotermnog pika OLO koji potiče od njegovog topljenja, u navedenim fizičkim smešama nastaje usled slabih interakcija, verovatno formiranja vodoničnih veza, između leka i polimera, što se može odraziti na viskozitet formulacije [189]. Pored toga, slabe elektrostatičke interakcije u smeši OLO i NH verovatno potiču od interakcije amino grupe OLO i karboksilne grupe NH.

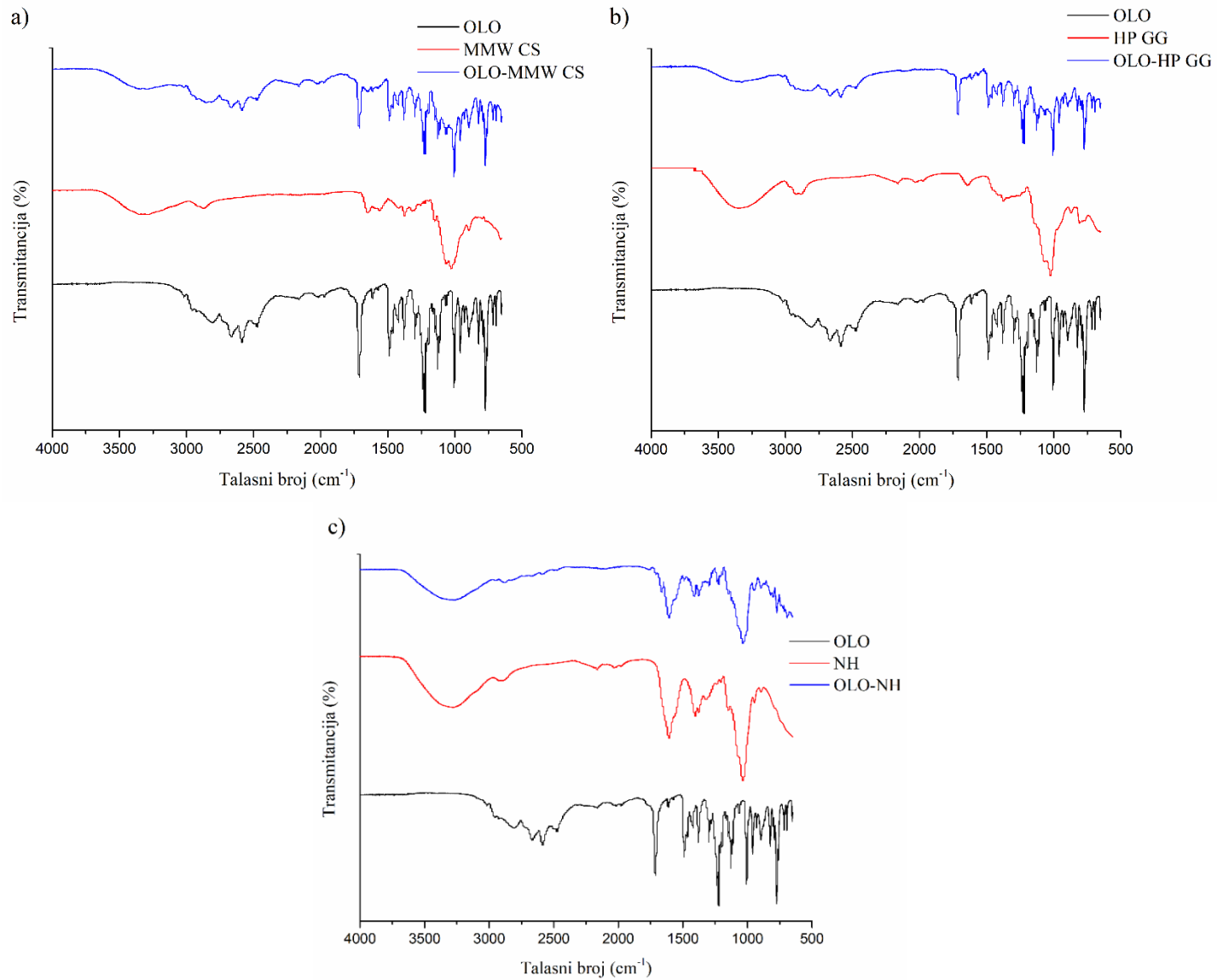
Slično ponašanje može se uočiti i u kombinaciji druge lekovite supstance sa istim polimerima. Na termogramu fizičke smeše KF-MMW CS (slika 4.13a) uočavaju se dva endotermna pika na 93,5 °C i 199,7 °C koji potiču od MMW CS i topljenja KF i blagi egzotermni pik na oko 300 °C koji takođe potiče od MMW CS. Na slici 4.13b uočava se da termogram fizičke smeše KF-HP GG prikazuje sasvim blagi široki endotermni pik oko 100 °C koji potiče od HP GG i jedan oštri endotermni pik na 197,5 °C koji potiče od topljenja KF. Na termogramu fizičke smeše KF-NH (slika 4.13c) izostaje egzotermni pik koji potiče od dekompenzacije polimera, a topljenje KF sada se dešava pri temperaturi 195,2 °C.

Sve navedene promene koje se mogu primetiti u fizičkim smešama lekovitih supstanci i odabranih polimera, a koje se ogledaju u pomeranju temperatura topljenja OLO i KF prema nižim vrednostima i znatno nižim vrednostima entalpija u smeši, nastaju pre svega kao posledica fizičkih interakcija i ne dovode do međusobne inkompatibilnosti [190].

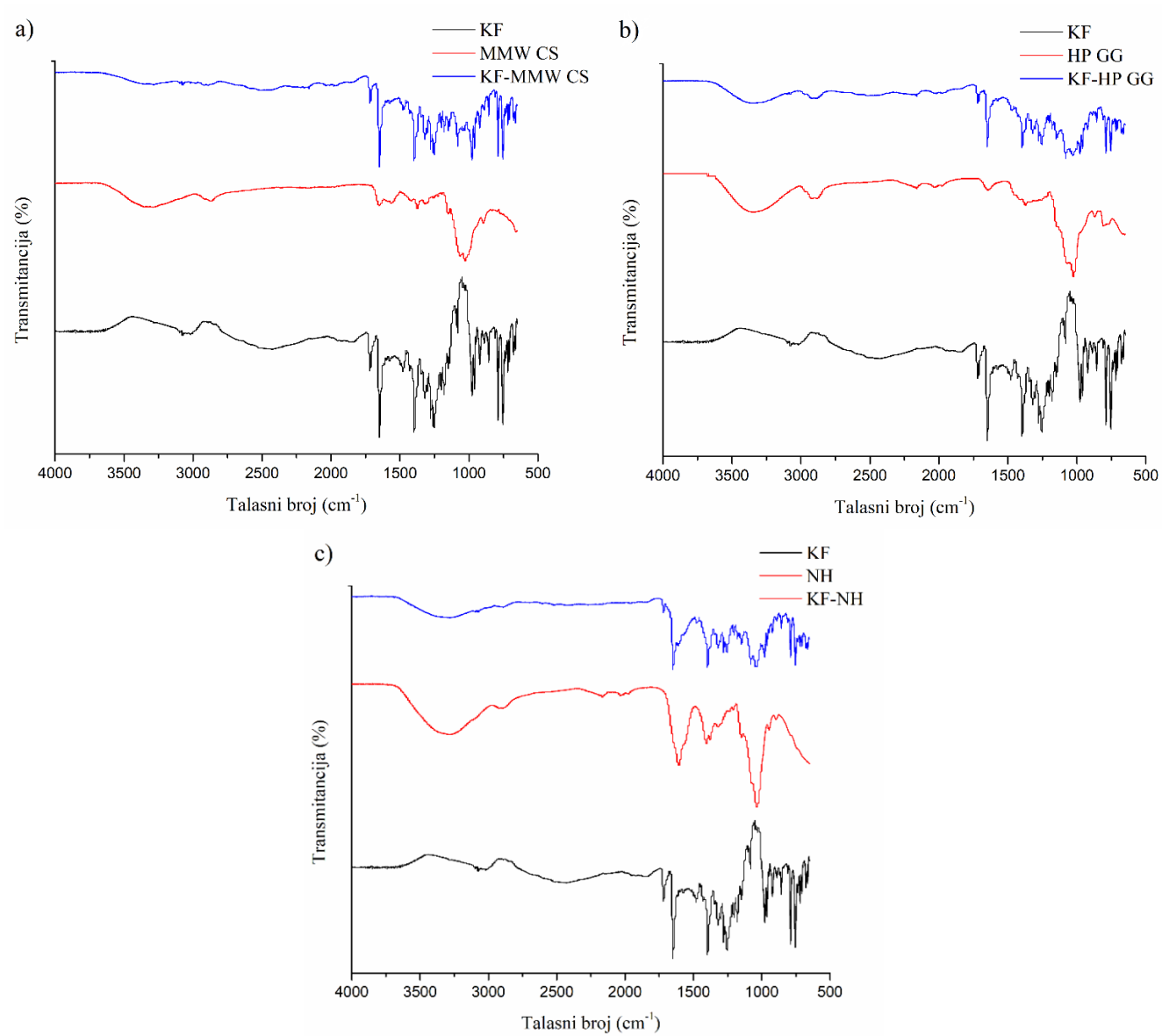
Osnovni pikovi MMW CS, HP GG i NH javljaju se na približno istim pozicijama na njihovim pojedinačnim termogramima i na termogramima njihovih fizičkih smeša (slike 4.14a i 4.14b). Stoga, može se zaključiti da nije došlo do značajnih interakcija između ovih polimera koje bi uticale na njihove fizičko-hemijske ili funkcionalne karakteristike, što omogućava njihovo kombinovanje u sastavu ispitivanih formulacija. Posmatrane interakcije između leka i polimera dalje su analizirane FT-IR spektroskopijom.

4.2.2.2 Infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR*)

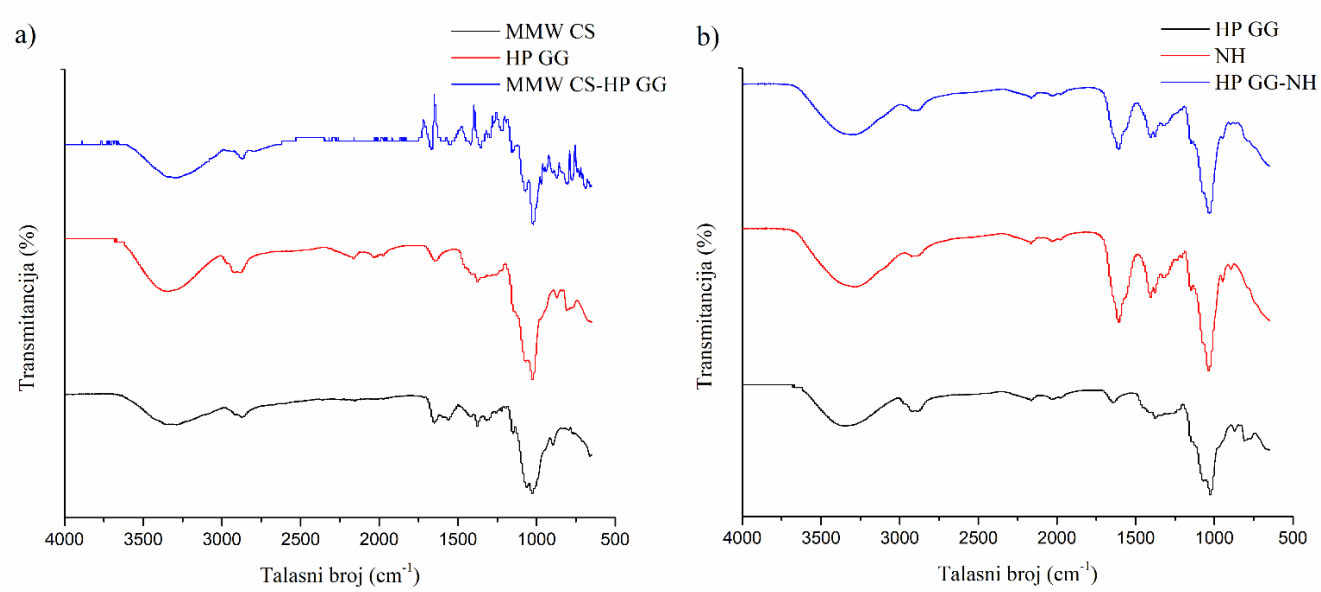
Na slikama (slikama 4.14-4.17) su prikazani FT-IR spektri OLO, KF, korišćenih polimera i njihovih fizičkih smeša.



Slika 4.15. FTIR spektri a) OLO, MMW CS i fizičke smeše (OLO-MMW CS), b) OLO, HP GG i fizičke smeše (OLO-HP GG), c) OLO, NH i fizičke smeše (OLO-NH)



Slika 4.16. FTIR spektri a) KF, MMW CS i fizičke smeše (KF-MMW CS), b) KF, HP GG i fizičke smeše (KF-HP GG), c) KF, NH i fizičke smeše (KF-NH)



Slika 4.17 FTIR spektri a) MMW CS, HP GG i fizičke smeše (MMW CS-HP GG), b) NH, HP GG i fizičke smeše (NH-HP GG)

FT-IR spektri model lekovitih supstanci i ispitivanih polimera su u saglasnosti sa spektrima prikazanim u literaturi. OLO (slika 4.15) je pokazao nekoliko karakterističnih pikova na $2806,4\text{ cm}^{-1}$ usled -C-H istezanja, pik na $2586,67\text{ cm}^{-1}$ nastaje usled -O-H istezanja, a na $1712,67\text{ cm}^{-1}$ kao posledica prisustva -C=O iz karboksilne grupe, dok je pik na $2667,43\text{ cm}^{-1}$ povezan sa primarnom amino grupom [183]. FT-IR spektar KF (slika 4.16) pokazuje karakteristične pikove oko 3400 cm^{-1} od vibracije istezanja primarne amino grupe -N-H i $1648,65\text{ cm}^{-1}$ od aromatične vibracije istezanja dvogube veze -C=C- , te slabe trake na $1481,88\text{ cm}^{-1}$ i $1717,41\text{ cm}^{-1}$ od metil i karboksilne grupe fumarne kiseline. Posmatrajući dalje spektar uočava se traka na $1396,45\text{ cm}^{-1}$ od fenolne -O-H grupe, te -C-H vibracija izvan ravni u supstituisanom etilenskom sistemu (-C=CH- (cis)) na $753,89\text{ cm}^{-1}$ [184].

Dobijeni spektar MMW CS pokazuje apsorpcione trake oko $3289,25\text{ cm}^{-1}$, tipično za -O-H vibracije i oko $2873,76\text{ cm}^{-1}$ što odgovara vibracijama -C-H istezanja. Karakteristične trake koje odgovaraju amino grupama hitozana nalaze se na $1651,57\text{ cm}^{-1}$ za -C=O istezanje (amid I), $1563,39\text{ cm}^{-1}$ za -N-H vibracije (amid II), te na $1374,66\text{ cm}^{-1}$ i $1316,88\text{ cm}^{-1}$ koje potiču od amida III [188]. Na FT-IR spektru HP GG apsorpcione trake na $3325,18\text{ cm}^{-1}$ potiču od istezanja -O-H grupa, dok se traka oko $2886,65\text{ cm}^{-1}$ pripisuje -C-H istezanju. Snažna traka na $1022,34\text{ cm}^{-1}$ nastaje zbog $\text{-CH}_2\text{-O-CH}$ istezanja. Dalje, može se primetiti da se -C-H savijanje od CH_3 (simetrično) i -O-H vibracija u ravni zajednički pojavljuju na $1376,98\text{ cm}^{-1}$ [186]. NH ispoljava karakterističan apsorpcioni pik na $1606,08\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja asimetričnu karbonilnu vibraciju. Frekvencija -C=O je nešto niža od one koja je uobičajena za karboksilnu grupu ($1780\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$) zbog rezonancije [191]. Jedna šira traka koja se javlja na $3285,36\text{ cm}^{-1}$ potiče od -C-H istezanja.

Karakteristične trake OLO i MMW CS (slika 4.15a) nalaze se na sličnim mestima i u spektru njihove fizičke smeše, izuzev pika koji odgovara -C-H istezanju koji se našao u novom položaju na 2852 cm^{-1} . Apsorpcione trake karakteristične za amid II i III blago su pomerene u spektru fizičke smeše OLO-MMW CS ($1491,11\text{ cm}^{-1}$ i $1378,99\text{ cm}^{-1}$), a i intenzitet karakterističnih OLO pikva je nešto niži. Ova razmatranja su u saglasnosti sa rezultatima DSC analize i mogu se pripisati elektrostatičkim interakcijama OLO i MMW CS.

Na slici 4.15b, u spektru fizičke smeše OLO-HP GG može se uočiti samo blago pomeranje trake koja odgovara -O-H istezanju alkoholne grupe HP GG, dok su ostali pikovi OLO i HP GG pozicionirani na isti način kao u pojedinačnim spektrima, što potvrđuje kompatibilnost OLO i ovog polimera. Takođe, u spektru fizičke smeše OLO-NH (slika 4.15c) dolazi do neznatnih promena u položaju pikova, te se sada pik koji potiče od -C-H istezanja nalazi na 3281 cm^{-1} , dok je pik sa spektra OLO koji odgovara -C=O ($1712,67\text{ cm}^{-1}$) istezanju u smeši pomeren na $1662,37\text{ cm}^{-1}$. Uočene blage promene u spektru fizičke smeše nastaju samo kao posledica nekovalentnih interakcija, a ne hemijskih reakcija između lekovite supstance i polimera.

Na slici 4.16a se može uočiti da se sve karakteristične trake KF i MMW CS nalaze u gotovo identičnim položajima u spektru fizičke smeše KF-MMW CS, što ukazuje na potpuno odsustvo međusobnih interakcija i dobru kompatibilnost leka i polimera. Slično se uočava i na spektru fizičke smeše KF i HP GG (slika 4.16b) gde se primećuju samo blaga pomeranja pojedinih traka i to onih koje odgovaraju istezanju alkoholne -O-H i -C-H grupe čiji novi položaji su $3336,46$ i $2891,13\text{ cm}^{-1}$. Sve prisutne neznatne promene u spektru fizičke smeše ukazuju na eventualno prisutne nekovalentne reakcije. Takođe, spektar fizičke smeše KF-NH (slika 4.16c) nema značajnijih promena u odnosu na pojedinačne spektre, odnosno svi karakteristični pikovi koji potiču od KF prisutni su i u spektru smeše. Zbog blizine apsorpcionih traka koje odgovaraju -C=O iz NH i -C=C iz KF stapaju se u jednu traku čiji pik se nalazi na $1648,18\text{ cm}^{-1}$. FT-IR spektar fizičke smeše MMW CS-HP GG (slika 4.17a) pokazuje neznatne promene u položaju apsorpcionih traka za -O-H i -C-H istezanje u odnosu na same polimere (novi pikovi nalaze se na $3348,03\text{ cm}^{-1}$ i $2871,19\text{ cm}^{-1}$, redom). Pikovi karakteristični za amino grupe iz MMW CS, takođe ispoljavaju samo blago pomeranje.

Dobijeni rezultati potvrđuju rezultate dobijene DSC analizom, da između MMW CS i HP GG nije došlo do značajnih interakcija kada se ovi polimeri nalaze u fizičkoj smeši. Isto se može zaključiti i kada je u pitanju kombinacija HP GG sa NH. Posmatrajući odvojene spektre HP GG i NH na slici

4.17b, uočava se da su međusobno slični, a i u spektru fizičke smeše nema razlika koje bi ukazale na eventualno postojanje inkompatibilnosti ova dva polimera.

Prema literaturnim podacima u kojima su razmatrane slične formulacije bazirane na polimerima, odsustvo novih pikova nakon dodatka lekovite supstance, ukazuje na kompatibilnost lekovite supstance i polimera [192, 193]. Slično tome, može se zaključiti da su kombinovani polimeri MMW CS i HP GG, te NH i HP GG međusobno kompatibilni, kao i da model lekovite supstance OLO i KF sa navedenim polimerima ne stupaju u hemijske interakcije koje bi mogle dovesti do promena u strukturi, fizičko-hemijskim ili funkcionalnim karakteristikama polimera i samih formulacija.

4.2.3 Površinski napon i kontaktni ugao

Izmerene vrednosti površinskog napona (σ) ispitivanih formulacija kapi za oči sa OLO i referentne formulacije (Opatanol[®]), predstavljene su u tabeli 4.11. Za uzorke F4OLO i F5OLO površinski napon nije bilo moguće izmeriti.

Tabela 4.11. Vrednosti površinskog napona, kontaktnog ugla i koeficijenta rasprostiranja ispitivanih kapi za oči sa OLO

	Površinski napon $\sigma \pm SD$ (mN/m)	Kontaktни ugao $\theta \pm SD$ (°)	Koeficijent rasprostiranja S (mN/m)
F1OLO	54,6 \pm 0,8*	64,5 \pm 4,1*	-31,1*
F2OLO	48,9 \pm 0,9	47,7 \pm 4,2*	-16,1*
F3OLO	50,3 \pm 1,4*	26,8 \pm 2,7*	-5,52
F4OLO	×	32,4 \pm 2,3	×
F5OLO	×	10,9 \pm 1,6*	×
Opatanol [®]	43,3 \pm 3,3	34,3 \pm 6,8	-7,4

*p < 0,05 u poređenju sa referentnom formulacijom

U studiji koju su sprovedeli Brockman i sar. [194] utvrđeno je da OLO i KF poseduju površinsku aktivnost. Pri tome OLO, za razliku od KF, pokazuje manji afinitet za interakcije sa međupovršinom argon/voda, ali i sa fosfolipidnim monoslojem. Dodatno, u navedenoj studiji izmereni maksimalni površinski napon za OLO (koncentracija OLO u rastvoru pufera 5 mM) iznosio je 38 mN/m i bio je znatno niži od onog koji je izmeren u prisustvu KF u jednakoj molarnoj koncentraciji (42–45 mN/m) [194].

Izmerena vrednost površinskog napona referentne formulacije (Opatanol[®]) nalazi se u opsegu koji odgovara normalnom površinskom naponu suzne tečnosti (40–46 mN/m) [2]. Površinski napon formulacije F2OLO ne odstupa značajno od navedenog opsega verovatno zbog prisustva HP GG kojoj se pripisuje posedovanje umerene površinske aktivnosti [163]. Sa druge strane, formulacije koje u svom sastavu sadrže MMW CS, polimer za koji se u literaturi navodi da nema izraženu površinsku aktivnost [165], imaju nešto viši površinski napon, posebno formulacija koja kao jedini polimer sadrži MMW CS (F1OLO).

U literaturi se navodi da preparati koji se primenjuju na oko, a imaju niži površinski napon od normalne vrednosti površinskog napona suzne tečnosti, mogu da dovedu do destabilizacije suznog filma [195], ali i do osećaja neprijatnosti i bola [2]. Nasuprot tome, veliki broj preparata koji se nalazi na tržištu, a koji su indikovani za terapiju sindroma suvog oka, ima viši površinski napon od

normalnog napona suzne tečnosti. U studiji koju su realizovali Han i sar. [195], ispitivane su vrednosti površinskog napona oftalmoloških preparata koji se izdaju bez lekarskog recepta (engl. *over the counter*, OTC) sa tržišta Velike Britanije [195]. Preparati koji se koriste za terapiju sindroma suvog oka imali su znatno viši površinski napon (65,6–70,2 mN/m) od normalne vrednosti površinskog napona suznog filma, pre svega radi poboljšanja stabilnosti suznog filma i bolje lubrikacije površine oka. Slično prethodnoj studiji [195], merenjem površinskog napona dva preparata tipa veštačkih suza (SU i Pro) sa tržišta Republike Srbije (tabela 3.4), dobijene su vrednosti $67,05 \pm 3,80$ mN/m za SU, odnosno $73,50 \pm 0,10$ za Pro mN/m.

Na osnovu navednog, može se zaključiti da i formulisane kapi sa OLO imaju zadovoljavajuće vrednosti površinskog napona koje će nakon primene na oku omogućiti održavanje stabilnosti suznog filma.

Sledeći parametar koji je posmatran radi procene potencijalnog ponašanja ispitivanih formulacija nakon primene na oku, jeste merenje kontaktnog ugla. Vrednosti izmerenog kontaktnog ugla za kapi za oči sa OLO prikazane su u tabeli 4.11. Najniže vrednosti kontaktnog ugla, statistički značajno niže u odnosu na referentnu formulaciju ($p < 0,05$), zabeležene su kod formulacija koje sadrže kombinaciju HP GG sa MMW CS (F3OLO), odnosno HP GG sa NH (F5OLO). Značajno veća vrednost kontaktnog ugla ($p < 0,05$) u odnosu na referentnu formulaciju, izmerena je kod formulacija F1OLO i F2OLO, dok je formulacija F4OLO imala sličan kontaktni ugao kao komercijalni preparat ($p > 0,05$).

Poređenje različitih stanja kvašenja obično se vrši na osnovu posmatranja ravnotežnih koeficijenata rasprostiranja ($S \leq 0$) koji predstavljaju odnos površinske slobodne energije i njene vrednosti potrebne za kompletno kvašenje [196]. Što je kontaktni ugao manji, to je koeficijent rasprostiranja veći, ukazujući na lakše rasprostiranje i izraženije osobine kvašenja upotrebene formulacije [142, 197]. Najviši koeficijent rasprostiranja izračunat je za formulaciju F3OLO (-5,5), a moglo bi se pretpostaviti, na osnovu niske vrednosti kontaktnog ugla, svega $10,9^\circ$, da je koeficijent rasprostiranja formulacije F5OLO takođe nizak. Za uzorak F5OLO (za koga je izmerena najniža vrednost kontaktnog ugla), kao i za uzorak F4OLO, zbog nemogućnosti zadržavanja kapljice kako bi se izvršilo merenje merenja nije izmeren površinski napon.

Na osnovu navedenih rezultata, pre svega niskih vrednosti kontaktnog ugla, očekuje se da će navedene formulacije, pored već istaknutih reoloških i mukoadezivnih karakteristika imati i izuzetno dobra svojstva kvašenja i rasprostiranja, nakon primene na oku.

Izmerene vrednosti površinskog napona ispitivanih formulacija kapi za oči sa KF i referentne formulacije (KFRef), predstavljene su u tabeli 4.12. Kao što je prethodno navedeno, uočava se da kapi za oči sa KF imaju znatno više vrednosti površinskog napona od kapi za oči sa OLO zbog ponašanja same lekovite supstance na međupovršini faza [194]. Vrednosti površinskog napona za formulisane kapi za oči, značajno su niže od vrednosti za referentnu formulaciju (KFRef) koja ne sadrži polisaharidne polimere (72,7 mN/m) ($p < 0,05$). Površinski napon referentne formulacije je izrazito visok, iako ova formulacija u svom sastavu sadrži glicerol za koji je poznato da snižava površinski napon [195]. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da se površinski napon ispitivanih formulacija značajno razlikuje u odnosu na normalni površinski napon suzne tečnosti, izuzev za formulaciju F5KF. Ovim se još jednom potvrđuje izvesna površinska aktivnost HP GG prisutne u ovoj formulaciji, kao i u formulaciji F2KF. Analogno rezultatima merenja površinskog napona kapi za oči sa OLO, primećuje se viši površinski napon kod formulacija koje sadrže MMW CS, naročito formulacije F1KF u kojoj se MMW CS nalazi kao jedini polimer. Najviši površinski napon, slično referentnoj formulaciji ($p > 0,05$), pokazuje formulacija F4KF koja sadrži NH kao jedini polimer čija slabo izražena površinska aktivnost nije dovela do značajnog sniženja površinskog napona u odnosu na vodeni rastvor (KFRef).

Poznato je da niži površinski napon formulacija, omogućava lakše kvašenje hidrofobne površine epitela rožnjače [142, 168]. Takođe, tečnosti koje pokazuju niži površinski napon od površinskog napona suzne tečnosti, negativno utiču na stabilnost suznog filma [195]. Na osnovu dobijenih vrednosti površinskog napona ispitivanih formulacija kapi za oči sa KF, slično kao kod kapi za oči sa OLO, može se zaključiti da su vrednosti površinskog napona prihvatljive za

oftalmološke preparate. U skladu s tim, ne očekuje se da će formulisane kapi dovesti do destabilizacije suznog filma nakon njihove primene, a očekuju se znatno bolja svojstva kvašenja hidrofobne površine rožnjače u odnosu na referentnu formulaciju (KRef).

Tabela 4.12. Vrednosti površinskog napona, kontaktnog ugla i koeficijenta rasprostiranja ispitivanih kapi za oči sa KF

Oznake uzoraka	Površinski napon $\sigma \pm SD$ (mN/m)	Kontaktni ugao $\theta \pm SD$ (°)	Koeficijent rasprostiranja S (mN/m)
F1KF	58,1 \pm 0,2*	40,7 \pm 1,4*	-14,2*
F2KF	50,4 \pm 6,9*	47,5 \pm 10,3*	-16,3*
F3KF	53,1 \pm 0,1*	51,3 \pm 0,8	-19,9*
F4KF	69,3 \pm 0,4	50,1 \pm 12,2	-24,8*
F5KF	49,9 \pm 0,3*	52,1 \pm 4,0	-31,1
KRef	72,7 \pm 0,2	55,1 \pm 1,8	-31,1

*p < 0,05 u poređenju sa referentnom formulacijom

Pored površinskog napona, izmeren je i kontaktni ugao ispitivanih formulacija i referentne formulacije (KRef). Dobijene vrednosti prikazane su u tabeli 4.12.

Izmereni kontaktni ugao ispitivanih formulacija kapi za oči bio je nešto niži u odnosu na kontaktni ugao referentne formulacije. Statistički značajno niža (p < 0,05) vrednost kontaktnog ugla dobijena je samo za formulacije F1KF (40,7°) i F2KF (47,5°), suprotno rezultatima dobijenim tokom ispitivanja kapi za oči sa OLO, što još jednom ukazuje na različito ponašanje ova dva antihistaminika na međupovršini vazduh/voda [194].

Dodatno, vrednosti koeficijenta rasprostiranja izračunati su za sve ispitivane formulacije (tabela 4.11). Koeficijenti S za sve formulacije, izuzev formulacije F5KF, bili su statistički značajno viši (p < 0,05) u odnosu na koeficijent S izračunat za referentnu formulaciju. Ovi rezultati ukazuju na to da je rasprostiranje navedenih formulacija energetski značajno povoljnije i da ispitivane formulacije imaju bolja vlažeća svojstva od vodenog rastvora KF (KRef). Stoga, može se pretpostaviti da će ove formulacije imati sposobnost bržeg i lakšeg kvašenja i rasprostiranja, kao i adhezije za površinu rožnjače. Sa druge strane, niži koeficijent rasprostiranja za formulaciju F5KF, bez statistički značajne razlike (p > 0,05) u odnosu na referentni rastvor, verovatno je posledica višeg viskoziteta ove formulacije koji usporava njeno širenje na hidrofobnoj podlozi [142]. Viskozitet i izražena mukoadhezivna svojstva vehikuluma koji je korišćen za izradu ove formulacije (sadrži kombinaciju polimera NH i HP GG) doprineće dužem kontaktu lekovite supstance sa površinom rožnjače, što bi moglo kompenzovati nešto sporije rasprostiranje formulacije po površini rožnjače.

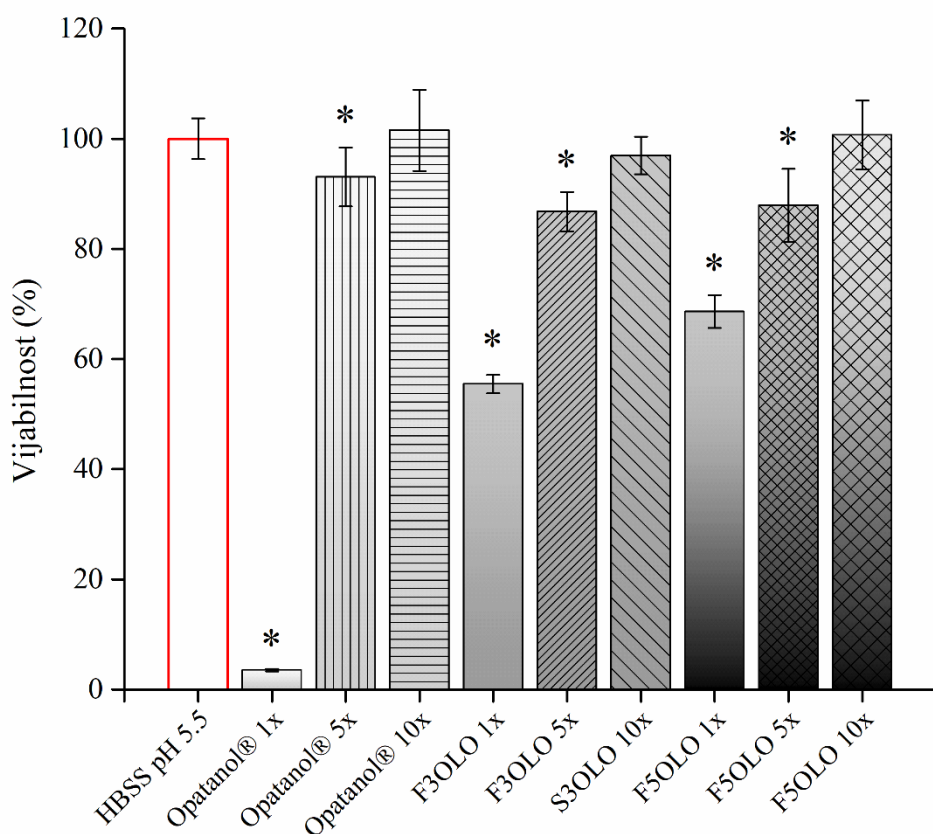
4.2.4 Studija permeabilnosti na HCE-T ćelijskim modelima

Besmrtna ćelijska linija humanog epitela rožnjače (HCE-T) je najdetaljnije okarakterisana humana ćelijska linija za ispitivanje transkornealne permeabilnosti. U ovom istraživanju, kao što je navedeno u odeljku 3.2.2.6, korišćena su dva ćelijska modela (Model I i II) koji se međusobno razlikuju u barijernim svojstvima, kako bi se dobio potpuniji uvid u transkornealnu permeaciju model lekovitih supstanci i uticaj samog nosača na permeaciju. Ovi ćelijski modeli predstavljaju statičke modele epitela rožnjače, bez mogućnosti ispiranja izmenom suzne tečnosti. S obzirom na navedeno, formulacije primenjene na površinu modela ne razblažuju se tokom vremena kao što je to slučaj u *in*

in vivo sredini, te su zbog toga ćelijski modeli znatno osetljivi na potencijalni citotoksični efekat ispitivanih formulacija. Iz tog razloga, sprovedeno je preliminarno ispitivanje vijabilnosti Modela I, za koji postoje podaci iz prethodnih studija o većoj osetljivosti od Modela II, kako bi se odredili optimalni eksperimentalni uslovi na modelu na kojem do sada nije testiran sličan tip formulacija [198].

U preliminarnoj studiji, ispitana je vijabilnost Modela I nakon tretiranja ćelija komercijalnim preparatom Opatanol® kapi za oči i formulacijama F3OLO i F5OLO, kao najkompleksnijim ispitivanim formulacijama koje sadrže kombinacije polimera, MMW CS/HP GG, odnosno HP GG/NH. Vijabilnost modela ispitana je primenom MTT testa prema proceduri opisanoj u odeljku 2.3.8, nakon inkubacije sa navedenim kapima za oči nerazblaženim, te uz razblaženja pet i deset puta. Ćelije inkubirane u HBSS-u korišćene su kao kontrola 100% vijabilnosti.

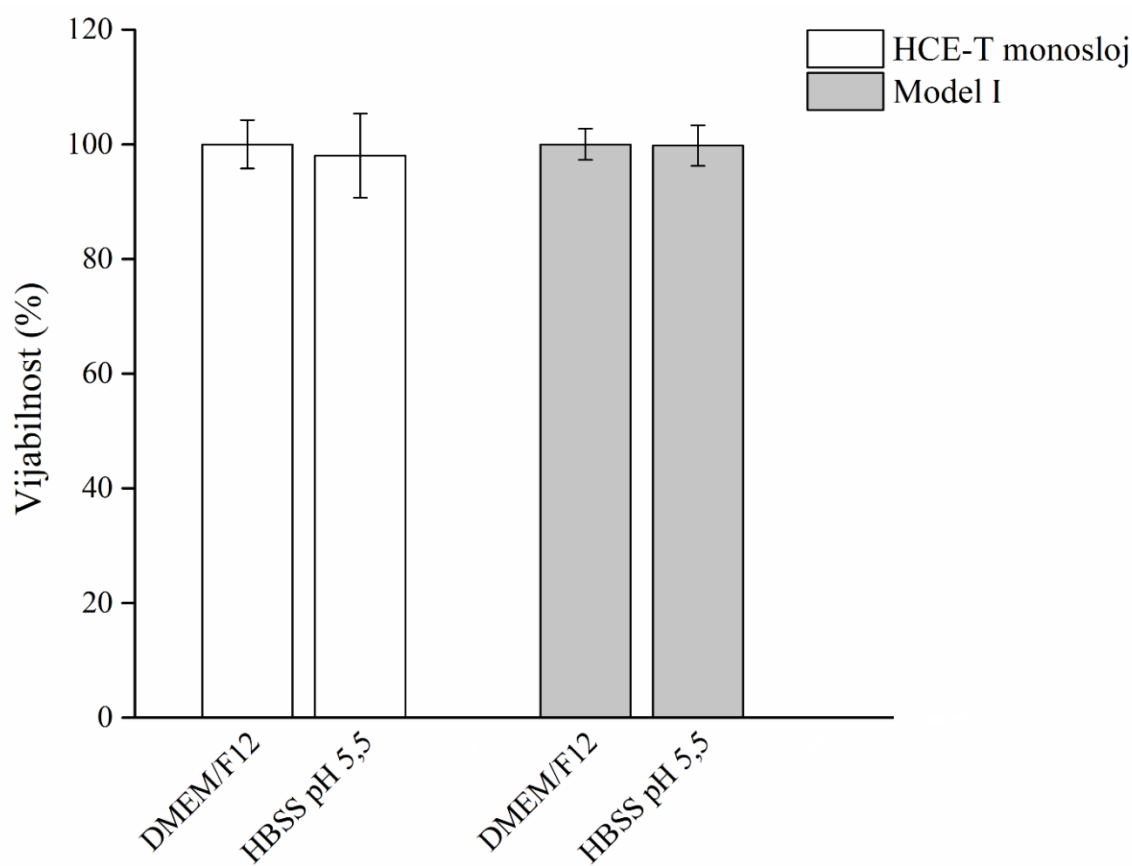
Dobijeni preliminarni rezultati, prikazani na slici 4.18, pokazali su da na ćelijsku vijabilnost nisu uticale kapi za oči koje su razblažene 10 puta u HBSS-u, tj. nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između vijabilnosti ćelija u ovoj grupi i kontrolnoj grupi (ćelije inkubirane u HPSS-u). Testiranje 10 puta razblaženih uzoraka je u saglasnosti sa prethodnim studijama na istom [145, 199] ili sličnom [144] ćelijskom modelu.



Slika 4.18. Vijabilnost (%) HCE-T ćelijskog Modela I određena primenom MTT testa, nakon inkubacije sa ispitivanim formulacijama F3OLO i F5OLO i Opatanol® kapima za oči nerazblaženim i razblaženim 5 i 10 puta. Ćelije inkubirane u HBSS pH 5,5 su korišćene kao kontrola 100% vijabilnosti. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD ($n = 6-9$) (* $p < 0,05$ u poređenju sa kontrolom)

Dodatno, u toku preliminarnih studija izvršeno je ispitivanje osetljivosti Modela I na prisustvo pufera pH vrednosti 5,5, kako bi se utvrdio uticaj nešto niže pH vrednosti u odnosu na fiziološku vrednost. S obzirom da su ispitivane formulacije imale pH vrednost oko 5,5, za njihovo razblaženje korišćen je i pufer HBSS iste pH vrednosti. Preliminarni rezultati su pokazali da nije bilo statistički

značajne razlike ($p < 0,05$) u vijabilnosti ćelija u monosloju i Modelu I inkubiranih u HBSS pH 5,5 u odnosu na ćelije inkubirane u medijumu za ishranu (slika 4.19).



Slika 4.19. Vijabilnost (%) HCE-T monosloja i Modela I određena MTT testom nakon 2 h inkubacije u HBSS-u (pH 5,5). Ćelije inkubirane u medijumu DMEM/F-12 služile su kao negativna kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD ($n = 30$ i 6 za monosloj, odnosno Model I, redom)

Na početku studije permeabilnosti, pre dodavanja ispitivanih formulacija, meren je TEER oba ćelijska modela, kao mera barijernog integriteta. Merenje TEER-a predstavlja ustaljenu metodu za analizu ukupnog električnog otpora ćelijskog sloja kao mere jačine uskih međućelijskih veza, koje okružuju ćelije neposredno ispod njihovih apikalnih površina. Ukupan električni otpor ćelijskog sloja sastoji se od paracelularnog i transcelularnog električnog otpora [200]. U idealnim uslovima, električni otpor HCE-T ćelijskog modela trebalo bi da bude uporediv sa električnim otporom sveže izolovane rožnjače [114]. Odnosno, smatra se da HCE-T ćelijski model ima adekvatna barijerna svojstva, ako je njegova izmerena vrednost TEER-a iznad $400 \Omega \times \text{cm}^2$ [114]. Izmerene vrednosti TEER-a za HCE-T Model II (tabele 4.13 i 4.14), pre samog početka studije permeabilnosti bile su ekstremno visoke.

Prethodno je navedeno da su za uzgoj HCE-T ćelijskih modela korišćene polikarbonatne membrane (Transwell[®]) dve različite veličine pora, $0,4 \mu\text{m}$ (Model I) i $3 \mu\text{m}$ (Model II). HCE-T ćelije migriraju kroz membranu veličine pora $3 \mu\text{m}$, tako da se Model II sastoji od apikalnog lipofilnog HCE-T epitelnog monosloja i bazolateralnog lipofilnog monosloja kojeg čine migrirane HCE-T ćelije. Sa druge strane, Model I ima značajno manji promer veličine pora i HCE-T ćelije nemaju mogućnost migracije na bazolateralnu stranu polikarbonatne membrane, već formiraju apikalnu epitelnu strukturu na polikarbonatnoj podlozi. Uprkos formiranju višeslojnog epitela koji dobro odražava strukturalna svojstva epitela rožnjače *in vivo*, merenje TEER-a ukazuje na nedostatak ekspresije, odnosno disfunkciju međućelijskih tesnih kompleksa, tj. na slabu barijernu funkciju Modela I. Kao rezultat nedovoljnih barijernih svojstava, Model I se pokazao kao znatno propustljiviji u odnosu na Model II i izolovanu rožnjaču. Model II ne formira višeslojnu epitelnu strukturu, koja je

karakteristična i dobro poznata kod rožnjače. Međutim, Model II ima jedinstvene karakteristike, bazolateralni lipofilni sloj formiran od migriranih HCE-T ćelija, koji može predstavljati dodatnu barijeru za transport lekovitih supstanci, zapravo oponaša najdublji, endotelni lipidni sloj rožnjače [109, 201]. Dakle, ovako visoke vrednosti TEER-a izmerene kod Modela II (tabele 4.13 i 4.14) mogu se objasniti održavanjem čvrstih međućelijskih veza između ćelija apikalnog i bazolateralnog epitelnog lipofilnog monosloja. Preciznije, ranije je utvrđeno da su migrirane ćelije polarizovane i uz zadržavanje međućelijskih spojnih kompleksa, prouzrokuju visoke vrednosti TEER-a [202].

Uzimajući u obzir dobra barijerna svojstva Modela II (TEER: 1400–1859 $\Omega \times \text{cm}^2$) u odnosu na Model I (TEER: 93–104 $\Omega \times \text{cm}^2$) i izolovanu rožnjaču (TEER: 542–729 $\Omega \times \text{cm}^2$) [201], može se zaključiti da Model II jako dobro odražava transport leka kroz rožnjaču što je prethodno potvrđeno i u *ex vivo* studiji [201]. Ovaj model je adekvatan i za komparativne studije permeabilnosti lekovite supstance iz različitih formulacija, sa i bez pojačivača penetracije kao što je MMW CS, u ovom slučaju F1OLO i F3OLO, odnosno F1KF i F3KF, jer je poznato da MMW CS utiče na slabljenje ili reverzibilno raskidanje čvrstih veza [203]. TEER je meren i tokom studije permeabilnosti na Modelu II i to na tri pozicije u svakom bunariću i izračunata je srednja vrednost ($n = 9$) za svaku formulaciju, što je prikazano na slici 4.20.

Tabela 4.13. Vrednosti prividnih permeacionih koeficijenata (P_{app}) OLO na HCE-T ćelijskim modelima i PAMPA testu

	Model I		Model II		PAMPA
	P_{app} (10^{-7} cm/s) \pm SD (10^{-8} cm/s)	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	P_{app} (10^{-7} cm/s) \pm SD (10^{-8} cm/s)	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	P_{app} (10^{-7} cm/s)
F1OLO	35,1 \pm 1,8*	102 \pm 5	5,5 \pm 4,8	1794 \pm 39	64,6 \pm 2,9*
F2OLO	14,3 \pm 0,5	104 \pm 5	3,1 \pm 5,1	1859 \pm 106	35,9 \pm 1,0*
F3OLO	20,4 \pm 1,1	104 \pm 13	4,5 \pm 5,5	1792 \pm 49	69,4 \pm 3,8*
F4OLO	10,4 \pm 5,0*	103 \pm 6	2,7 \pm 5,4*	1808 \pm 13	76,2 \pm 2,2*
F5OLO	10,8 \pm 0,2*	101 \pm 5	4,4 \pm 4,1	1780 \pm 37	81,1 \pm 3,5*
Opatanol®	19,4 \pm 2,2	93 \pm 8	4,5 \pm 3,1	1400 \pm 191	43,7 \pm 1,4

* $p < 0,05$ u poređenju sa referentnom formulacijom

Difuzija lekovitih supstanci kroz epitelne barijere zavisi od hemijske prirode, veličine i konformacije molekule, particionog koeficijenta, formiranja vodoničnih veza, stepena jonizacije i drugih faktora. Stepenu otpora koji pružaju pojedini slojevi rožnjače može da se razlikuje u zavisnosti od fizičko-hemijskih svojstva koji vladaju pri procesu penetracije [1, 204]. Epitel koji ima lipidnu prirodu i sastoji se *in vivo* od pet slojeva epitelnih ćelija predstavlja osnovnu barijeru, naročito za difuziju jonskih i relativno hidrofobnih jedinjenja. Hidrofilna stroma predstavlja najznačajniji ograničavajući faktor za difuziju hidrofobnih jedinjenja, što svakako treba uzimati u obzir pri tumačenju rezultata dobijenih nakon studije permeabilnosti sprovedene na HCE-T ćelijskim modelima koji se isključivo zasnivaju na epitelnom mono- ili višesloju bez prisustva hidrofilne strome [201].

Znatno više vrednosti P_{app} dobijene za sve testirane formulacije na Modelu I, u odnosu na one dobijene na Modelu II verovatno potiču od značajno nižih vrednosti TEER-a izmerenih za ovaj ćelijski model [198]. Vrednosti P_{app} OLO izračunate nakon studije permeabilnosti na Modelu I su više od 2,5 do 6,5 puta u odnosu na odgovarajuće vrednosti P_{app} koje su dobijene nakon korišćenja ćelijskog Modela II (tabela 4.13). U poređenju sa lekovitim supstancama testiranim u prethodnoj studiji na istim modelima [201], slične razlike u vrednostima P_{app} između Modela I i II mogu se primetiti kod hloramfenikola (~ 4 puta) i deksametazona (3,26 puta) viša vrednost P_{app} dobijena za Model I u odnosu na Model II, što može ukazati na paracelularni put, kao jedan od najznačajnijih

puteva permeacije ovih lekova. Obe navedene lekovite supstance, hloramfenikol i deksametazon, su elektroneutralne, baš kao i OLO koji se pri pH vrednosti ispitivanja permeabilnosti (pH 5,5) nalazi u cviterjonskom obliku. Međutim, OLO pokazuje oko 4 puta, odnosno oko 6 puta, niže vrednosti P_{app} na oba modela, verovatno zbog znatno niže lipofilnosti ($\log D_{n\text{-oktanol/pufer}}$ pH 7,4 iznosi 0,3) [205] u odnosu na hloramfenikol ($\log D_{n\text{-oktanol/pufer}}$ pH 7,4 iznosi 1,08) [206] ili deksametazon ($\log D_{n\text{-oktanol/pufer}}$ pH 7,4 iznosi 1,5) [110].

Vrednosti P_{app} dobijene na Modelu I za OLO imaju sličan red veličine kao vrednosti dobijene u prethodnoj studiji za natrijum-fluorescein ($19,4 \times 10^{-7}$ cm/s i $26,17 \times 10^{-7}$ cm/s), ali smanjenje vrednosti P_{app} na Modelu II za natrijum-fluorescein je bilo veće od 15 puta. S obzirom da se natrijum-fluorescein smatra hidrofiličnim markerom za paracelularni put permeacije, može se pretpostaviti da permeacija OLO pored paracelularnog, uključuje i transcelularni put. Tačan mehanizam kojim dolazi do permeacije lekovitih supstanci kroz epitelnu barijeru nije u potpunosti poznat. Uloga membranskih transportnih proteina ne može biti potpuno isključena [201]. Niže vrednosti P_{app} nakon studije permeabilnosti na Modelu II, mogu se objasniti izraženijim barijernim svojstvima ovog modela i znatno višim vrednostim TEER-a, čak i u odnosu na izolovanu rožnjaču. Praćenje TEER tokom studije permeabilnosti na ovom modelu ukazuje na značajno smanjenje TEER kod svih ispitivanih formulacija, uključujući i komercijalni preparat (slika 4.20). Ovaj fenomen se može objasniti prisustvom BAK u svim formulacijama i njegov dobro poznati i dokazani efekat na permeabilnost lekovitih supstanci kroz izolovanu rožnjaču i konjunktivu zeca [203, 207].

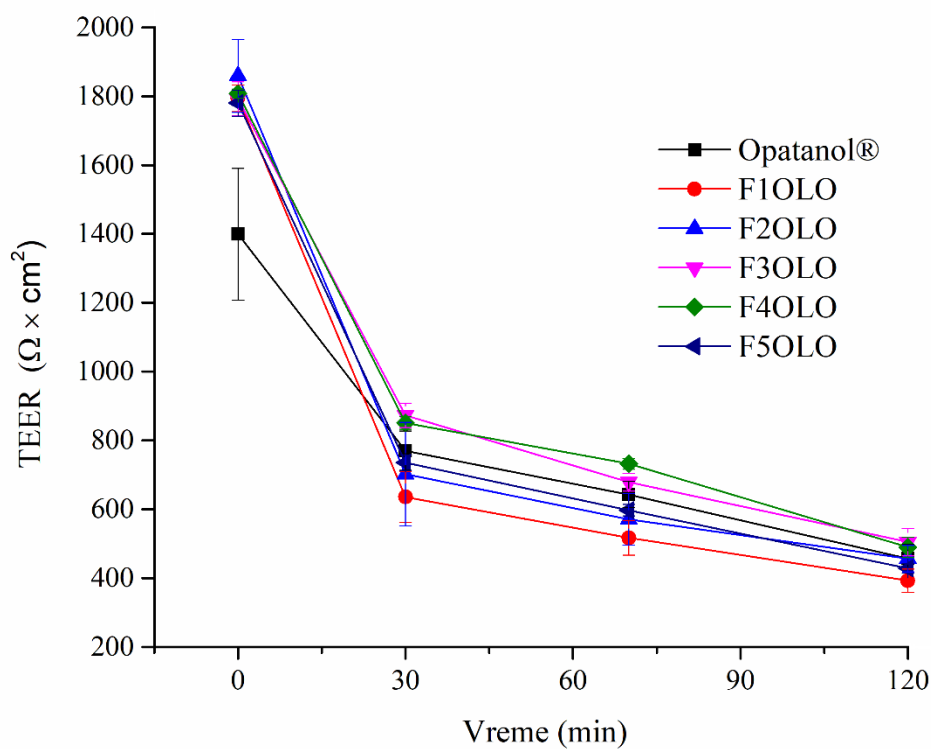
Rezultati studije permeabilnosti sprovedeni na oba HCE-T ćelijska modela pokazuju sličan red opadanja vrednosti P_{app} , za Model I: F1OLO > F3OLO > Opatanol® > F2OLO > F5 OLO > F4OLO, s tim da je P_{app} gotovo jednak za formulacije F4OLO i F5OLO; za Model II: F1OLO > F3OLO > Opatanol® > F5OLO > F2OLO > F4OLO. Oba ćelijska modela, bez obzira na razlike u TEER-u, pokazala su sposobnost da utvrde uticaj pojačivača penetracije (MMW CS) na permeabilnost lekovite supstance.

Poznato je da hitozan utiče na povećanje transepitelne permeabilnosti usled sposobnosti reverzibilnog ometanja čvrstih veza između epitelih ćelija, te bi Model II (visoke vrednosti TEER) trebalo da ukaže na aktivnost hitozana koja bi se odrazila na vrednost P_{app} . Međutim, veće razlike u vrednostima P_{app} između formulacija koje sadrže i ne sadrže MMW CS u svom sastavu, uočene su kod Modela I, što se može smatrati još jednom potvrdom da se mehanizam delovanja hitozana kao pojačivača penetracije zasniva i na drugim mehanizmima, kao što je interakcija sa fosfolipidima ćelijske membrane [37, 38]. Sa druge strane, daleko niže vrednosti P_{app} za formulacije F4 i F5 na Modelu I (nizak TEER) verovatno potiču od sporije permeacije lekovitih supstanci kroz višeslojni epitel.

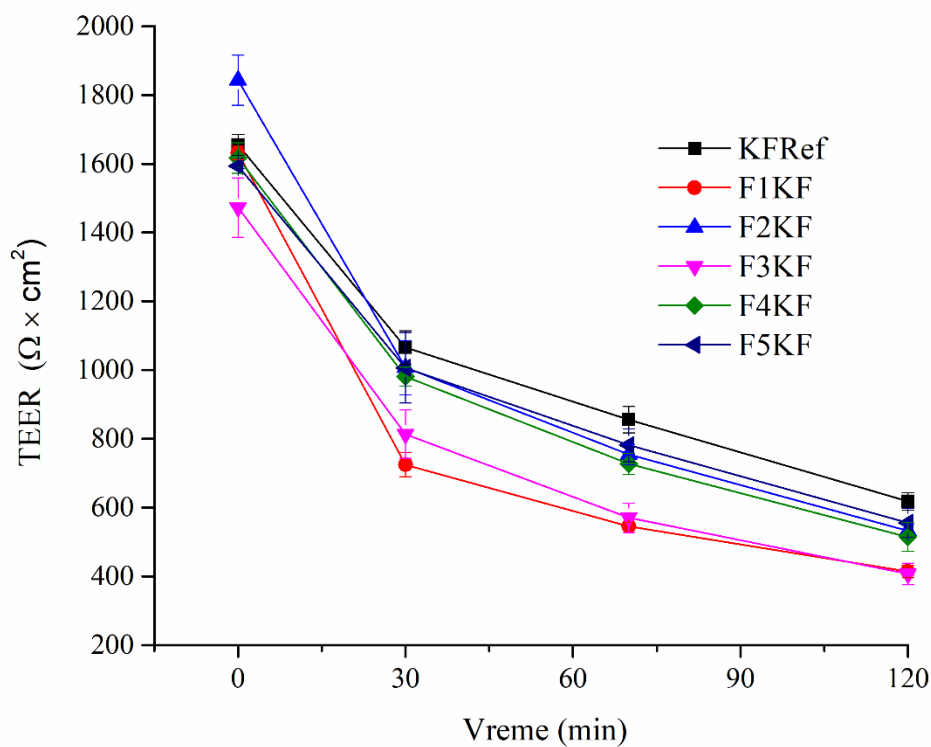
Ako se dobijeni rezultati uporede sa vrednošću P_{app} za OLO, objavljenim u permeacionoj studiji koja je sprovedena na Franz-ovoj difuzionoj ćeliji uz korišćenje sveže izolovane rožnjače koze, može se zaključiti da su oni za jedan do dva reda veličine niži u odnosu na tu vrednost ($1,36 \times 10^{-5}$ cm/s) [88]. Ispitivana formulacija *in situ* gela sadržavala je takođe pojačivač penetracije, benzododecinijum-bromid, koji deluje kao surfaktant i povećava penetraciju OLO, prije svega transćelijskim putem delujući na fosfolipidne dvosloje.

Pored toga, uzimajući u obzir hemijsku prirodu OLO pri fiziološkim pH vrednostima i nisku lipofilnost, ćelijski modeli koji se zasnivaju samo na jednom ili više slojeva epitelih ćelija bez prisustva hidrofилne strome, središnjeg sloja rožnjače, mogu predstavljati ograničenu metodu za predviđanje kornealne permeabilnosti OLO. Dodatno, transportni proteini koji učestvuju u aktivnom transportu kroz ćelijske membrane mogu biti funkcionalni i u jednostavnim epitelim ili složenijem HCE-T ćelijskim modelima. Međutim, zbog relativno visoke koncentracije OLO, aktivni transport, čak ako je i prisutan, zbog efekta zasićenja membranskih transportera, minimalno doprinosi ukupnoj permeabilnosti, ostavljajući pasivnu difuziju kao najzastupljeniji mehanizam. Svakako su neophodne detaljnije studije u pogledu transportnih mehanizama i pojedinih barijernih struktura modela rožnjače kako bi se u potpunosti razjasnili mehanizmi permeabilnosti ispitivanih lekovitih supstanci kroz korišćene modele [201].

a)



b)



Slika 4.20. Vrednosti TEER merene tokom eksperimenta permeabilnosti primenom HCE-T ćelijskog Modela II za a) testirane formulacije sa OLO i b) testirane formulacije sa KF. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SD (n = 6–9)

Analizom rezultata dobijenih nakon studije permeabilnosti na oba ćelijska modela (tabela 4.14) uočavaju se znatno više vrednosti P_{app} za KF u odnosu na odgovarajuće vrednosti dobijene za OLO. Objašnjenje se nalazi pre svega u različitoj hemijskoj prirodi ove dve lekovite supstance. Kako je ranije navedeno, KF je baza i pri fiziološkim vrednostima pH koje su ispod njegove pKa (8,43) vrednosti, pozitivno je naelektrisan jer prima proton. Pored toga, KF ima izraženiji lipofilni karakter i predviđena vrednost logP je dvostruko viša (3,55) u odnosu na logP vrednost OLO (0,75) [91]. Takođe, izračunata vrednost distribucionog koeficijenta (logD) pri pH 5,5 (uslovi ispitivanja), iznosi 1,43 što je opet dvostruko veća vrednost u odnosu na izračunatu vrednost logD za OLO (0,75) ili ranije navedeni podatak iz literature za $\log D_{n\text{-oktanol/pufer}}$ OLO pri pH 7,4 (0,3).

S obzirom da su dobijene vrednosti P_{app} gotovo ujednačene u studijama permeabilnosti na oba ćelijska modela, bez obzira na niske ili visoke vrednosti TEER-a, može se zaključiti da pasivna difuzija predstavlja primarni mehanizam penetracije KF kroz ćelijske membrane. Ranije predstavljeni literaturni podaci ukazuju da pozitivno naelektrisane molekule pokazuju znatno bolju transkornealnu permeabilnost u odnosu na negativno naelektrisane jer je rožnjača, pri fiziološkim pH vrednostima negativno naelektrisana [1, 204]. Uzimajući u obzir ranije dobijene rezultate na istim modelima za timolol koji je takođe pozitivno naelektrisan pri vrednostima pH nižim od 9,21, dobijene vrednosti P_{app} su istog reda veličine kao za KF. Dalje, u *ex vivo* studiji na izolovanoj rožnjači svinje, timolol je zadržao znatno više vrednosti P_{app} u odnosu na ostala ispitivana jedinjenja, a koja su bila neutralna ili negativno naelektrisana [201].

Kada se posmatraju vrednosti P_{app} ispitivanih formulacija kapi za oči sa KF (tabela 4.14), može se primetiti da su međusobno slične, izuzev F1KF, čiji P_{app} (Model II) pokazuje statistički značajnu razliku i preko 4 puta je viši u odnosu na vrednosti P_{app} referentne formulacije. MMW CS prisutan u F1KF je verovatno uticao na slabljenje čvrstih veza između HCE-T epitelnih ćelija i dodatno povećao permeabilnost KF. Slično, kao i kod P_{app} dobijenih za OLO, najniže vrednosti su dobijene za F2KF, F4KF i F5KF.

U literaturi se navode različiti podaci za vrednosti P_{app} u slučaju KF. Najčešće su u pitanju studije koje podrazumevaju primenu *ex vivo* izolovane rožnjače laboratorijskih životinja. U studiji koju su realizovali Soltani i sar. [184] izvršeno je ispitivanje koeficijenta permeacije (K_p , cm/min) KF iz Eudragit[®] nanočestica kroz izolovanu rožnjaču goveda korišćenjem Franz-ove difuzione ćelije. Dobijene vrednosti K_p KF kretale su se u rasponu $1,1\text{--}2,9 \times 10^{-5}$ cm/min, odnosno $1,1\text{--}4,8 \times 10^{-6}$ cm/s. Dodatno, ispitivana je permeabilnost KF iz kapi za oči koje sadrže polimerne ugušćivače, polisaharide iz semena tamarinda i hijaluronsku kiselinu, kroz izolovanu rožnjaču zeca [60]. Dobijene su vrednosti P_{app} istog reda veličine, i to $1,81 \times 10^{-5}$ cm/s za ispitivane kapi za oči, odnosno $2,46 \times 10^{-5}$ cm/s za kontrolni rastvor KF bez polimera. Dakle, razlika u vrednostima P_{app} objašnjava se time da upotrebljeni polimeri nisu imali uticaja na permeabilnost KF kroz rožnjaču. Dodatak polimera u formulaciju doveo je do snižavanja transkornealne permeabilnosti, što je verovatno bio uzrok smanjenja permeabilnosti i kod ispitivanih formulacija kapi za oči F2KF, F4KF i F5KF. Pretpostavlja se da mukoadhezivna svojstva ovih polisaharida (HP GG i NH, tdovode do poboljšanja barijernih funkcija epitela, što usporava permeaciju lekovitih supstanci kroz rožnjaču/model rožnjače. Doprinos navedenih polimera u poboljšanju okularne raspoloživosti ogleda se više u njihovim mukoadhezivnim svojstvima i omogućenom produženom zadržavanju preparata na mestu primene, nego u uticaju na penetraciju [60].

Tabela 4.14. Vrednosti prividnih permeacionih koeficijenata (P_{app}) KF na HCE-T ćelijskim modelima i PAMPA testu

	Model I		Model II		PAMPA
	P_{app} (10^{-5} cm/s) \pm SD (10^{-6} cm/s)	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	P_{app} (10^{-5} cm/s) \pm SD (10^{-6} cm/s)	TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$)	P_{app} (10^{-5} cm/s)
F1KF	1,7 \pm 0,7	86 \pm 3	4,4 \pm 4,3*	1632 \pm 19	19,5 \pm 4,7*
F2KF	1,2 \pm 0,5	98 \pm 5	1,0 \pm 0,9	1842 \pm 73	15,8 \pm 0,5*
F3KF	1,2 \pm 1,0	85 \pm 4	1,7 \pm 1,4	1473 \pm 86	14,4 \pm 2,5*
F4KF	1,0 \pm 0,6	67 \pm 2	1,0 \pm 1,9	1620 \pm 45	13,7 \pm 3,5*
F5KF	0,9 \pm 0,3	65 \pm 3	0,8 \pm 0,3	1593 \pm 7	24,2 \pm 5,4
KFRef	1,37 \pm 0,6	76 \pm 4	1,0 \pm 0,5	1654 \pm 34	25,0 \pm 3,4

*p < 0,05 u poređenju sa referentnom formulacijom

4.2.5 Test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA*)

Rezultati dobijeni sprovođenjem PAMPA testa prikazani su u tabeli 4.13 (OLO) i tabeli 4.14 (KF).

S obzirom na ranije navedenu hemijsku prirodu OLO pri fiziološkim pH vrednostima, koji se nalazi u cviterjonskom, elektroneutralnom obliku, usled jonizacije i kisele i bazne funkcionalne grupe, te mehanizmima uključenim u penetraciju kroz rožnjaču, PAMPA se može smatrati korisnom tehnikom za predviđanje permeabilnosti OLO iz kapi za oči. Nakon sprovedenog testa PAMPA dobijene su više vrednosti P_{app} , u poređenju sa odgovarajućim vrednostima dobijenim primenom ćelijskih modela naročito u odnosu na Model II (od 11,4 do 27,8 puta više vrednosti P_{app}), što je očekivano kada se uzmu u obzir visoke vrednosti TEER-a koje karakterišu ovaj model, odnosno prisustvo višeslojnog epitela kod Modela I (od 1,8 do 7,5 puta više vrednosti P_{app}). Rezultati dobijeni primenom PAMPA testa i ćelijskih modela nisu bili u korelaciji. Najveće razlike uočene su kod vrednosti P_{app} OLO iz formulacija F4OLO i F5OLO koje su bile gotovo dvostruko veće u odnosu na P_{app} iz komercijalnog preparata. Obe formulacije u svom sastavu sadrže NH, polisaharidni polimer koji je na izvestan način povećao permeabilnost OLO kroz fosfolipidnu membranu. Na osnovu literarnih podataka, može se pretpostaviti da je NH stupio u interakciju sa fosfatidilholinom u sastavu veštačke membrane i povećao njegovu propustljivost. U literaturi se sreću oprečni podaci vezani za tumačenje interakcije između hijaluronske kiseline i fosfatidilholina, od obrazovanja hidrofobnih interakcija i vodoničnog vezivanja koje omogućava unakrsno umrežavanje hijaluronske kiseline [208, 209], do negiranja postojanja interakcija između hijaluronske kiseline i fosfolipidnog modela membrane [210].

Relativno visoke vrednosti P_{app} OLO u odnosu na komercijalni preparat mogu se uočiti i kada su u pitanju formulacije koje sadrže MMW CS (F1OLO i F3OLO) što ukazuje na aktivnost MMW CS kao pojačivača penetracije što je potvrđeno rezultatima dobijenim u obe studije permeabilnosti. Naime, u literaturi postoje navodi, da hitozan pored sposobnosti reverzibilnog otvaranja i slabljenja čvrstih međućelijskih veza, može povećati permeabilnost kroz ćelijsku membranu bakterija zbog elektrostatičkih interakcija amino grupe sa fosforil grupama fosfolipidnih komponenata ćelijskih membrana [37]. Takođe, pokazano je da hitozan dovodi do lokalne distorzije fosfolipidnih lanaca usled kombinacije elektrostatičkih, dipolnih i hidrofobnih interakcija [38]. U novijoj sudiji [211] je utvrđeno da dolazi do umetanja hitozana i posledičnog širenja fosfolipidnog jednoslojnog filma, što

je dosta izraženije kada je u pitanju sloj anjonskog DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol) u odnosu na cviterjonski DPPC (dipalmitoilfosfatidilholin). Do umetanja hitozana dolazi usled interakcije sa anjonskim grupama što objašnjava i činjenicu zašto hitozan deluje antibakterijski, ali nije toksičan za sisare, jer mehanizam delovanja zavisi od naelektrisanja lipidne grupe.

Rezultati PAMPA testa dobijeni za KF (tabela 4.14) su slično za OLO viši u odnosu na rezultate dobijene na Modelu I (od 11,5 do 27 puta više vrednosti P_{app}), odnosno na Modelu II (od 4,5 do 30 puta više vrednosti P_{app}). U oba slučaja razlika je najniža za formulaciju F1KF, a najviša za F5KF. Najviša vrednost P_{app} KF dobijena je za referentnu formulaciju, vodeni rastvor bez dodatnih polisaharidnih polimera. U slučaju lekovitih supstanci koje pokazuju dobru permeabilnost, prilikom sprovođenja PAMPA testa, preporuka je da se ispitivane formulacije razblaže, kako bi se odredila adekvatna permeabilnost lekovite supstance. Ovo se može objasniti smanjenjem viskoziteta i relativne koncentracije svih supstanci (lekovite i pomoćnih) u sastavu kapi za oči koje mogu snažno da utiču na kinetiku propustljivosti veštačkih membrana [107]. Sve ispitivane formulacije su, prema protokolu opisanom u odeljku 3.2.2.7. razblažene PBS-om, uključujući i referentnu formulaciju KF. Stoga je jasno da će ova formulacija pri PAMPA testu za lekovitu supstancu, kao što je KF, čiji je primarni mehanizam permeacije pasivna difuzija, pokazati i najvišu vrednost P_{app} . Sa druge strane, razlika u vrednosti P_{app} za KF iz formulacije F5KF u odnosu na referentnu formulaciju nije statistički značajna ($p < 0,05$), te se na prvi pogled ne pronalazi uporište u prethodnom objašnjenju jer je u pitanju formulacija sa najvišom vrednošću viskoziteta, koja sadrži kombinaciju dva polimera. Međutim, ako se uzme u obzir da je za izradu navedene formulacije korišćen vehikulum V14 kod koga je razblaženje sa VST dovelo do izrazitog pada viskoziteta (tabela 4.2), mogu se objasniti najviše vrednosti P_{app} dobijene nakon sprovođenja PAMPA testa, ne samo za KF, nego i za OLO. Očigledno je da je dvostruko razblaženje navedene formulacije (F5KF) sa PBS-om izazvalo značajan pad viskoziteta, koji je omogućio bržu difuziju lekovite supstance kroz veštačku membranu. Pored navedenog, ranije je opisano i postojanje mogućnosti za interakciju NH i fosfolipida iz modela veštačke membrane, tj. delovanje NH kao blagog surfaktanta [164].

U skladu sa prethodnim literaturnim podacima [107, 212], PAMPA test se može smatrati korisnom tehnikom za predviđanje kornealne permeabilnosti u ranim fazama razvoja novih formulacija, u cilju sprovođenja skrininga i odabira manjeg broja formulacija koje će biti podvrgnute daljim ispitivanjima primenom specifičnijih i selektivnijih metoda. Bez obzira na izostanak potpune korelacije između studija permeabilnosti sprovedenih na ćelijskim HCE-T modelima i jednostavnom, racionalno razvijenom testu, bez prisustva ćelija, zasnovanom na primeni samo fosfolipida, dobijeni rezultati se mogu koristiti u cilju procene uticaja upotrebljenih polimera na permeabilnost lekvitih supstanci.

4.2.6 Ispitivanje stabilnosti kapi za oči sa model lekovitim supstancama

Fizičko-hemijska karakterizacija sprovedena u odgovarajućim vremenskim intervalima u okviru perioda čuvanja od godinu dana pri različitim uslovima, imala je za cilj procenu stabilnosti ispitivanih formulacija kapi za oči sa model lekovitim supstancama. Dodatno, sprovođenjem ubraznih testova, procenjena je stabilnost ispitivanih formulacija pri stresnim uslovima.

Vrednosti ispitivanih parametara u cilju procene stabilnosti pri različitim uslovima čuvanja navedeni su u tabelama 4.15-4.17.

Tabela 4.15. Vrednosti ispitivanih parametara za kapi za oči u toku 12 meseci čuvanja pri ambijentalnim uslovima (22 ± 2 °C)

V. int	Parametar	Oznaka uzorka									
		F1OLO	F2OLO	F3OLO	F4OLO	F5OLO	F1KF	F2KF	F3KF	F4KF	F5KF
Inicijalno	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,0	5,2	5,6	5,6	5,3	5,0	5,5	5,6	5,4	5,5
	Osmolalnost (mOsm/kg)	227	261	219	359	378	246	302	291	357	385
	Sadržaj aktivne supstance (%) [*]	107,21	106,15	111,02	101,13	111,06	108,41	102,03	98,55	99,71	95,94
	Viskozitet (na 25 1/s)	81,7	77,6	95,3	77,2	94,2	84,7	81,4	80,8	81,4	56,2
3 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	4,8	5,2	5,5	5,5	5,3	4,8	5,2	5,4	5,5	5,3
	Osmolalnost (mOsm/kg)	226	256	220	352	336	245	299	288	357	377
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	100,93	89,62	100,00	108,91	99,10	92,25	95,17	108,53	102,03	108,16
	Viskozitet (na 25 1/s)	66,9	63,9	89,2	82,6	89,9	77,1	79,1	59,1	41,6	37,6
6 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,1	5,3	5,6	5,6	5,3	5,1	5,6	5,6	5,8	5,36
	Osmolalnost (mOsm/kg)	225	256	225	355	379	243	298	285	350	381
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	93,46	90,57	98,20	106,93	89,19	x	x	x	x	x
	Viskozitet (na 25 1/s)	85,9	84,5	81,7	84,6	81,5	87,1	83,5	90,5	75,5	76,0
12 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,0	5,2	5,5	5,6	5,3	5,0	5,4	5,5	5,5	5,6
	Osmolalnost (mOsm/kg)	231	262	228	357	377	247	303	290	356	387
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	94,01	94,62	87,66	98,11	90,00	97,59	92,33	97,35	98,26	99,70
	Viskozitet (na 25 1/s)	79,2	82,5	87,7	75,1	86,6	77,2	84,1	87,2	63,6	90,3

^{*}u odnosu na deklarirani sadržaj (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

[#]u odnosu na inicijalnu vrednost (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

Tabela 4.16. Vrednosti ispitivanih parametara za kapi za oči u toku 12 meseci čuvanja u frižideru (2–8 °C)

V. int	Parametar	Oznaka uzorka									
		F1OLO	F2OLO	F3OLO	F4OLO	F5OLO	F1KF	F2KF	F3KF	F4KF	F5KF
Inic.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,0	5,2	5,6	5,6	5,3	5,0	5,5	5,6	5,4	5,5
	Osmolalnost (mOsm/kg)	227	261	219	359	378	246	302	291	357	385
	Sadržaj aktivne supstance (%) [*]	102,65	109,03	123,01	104,52	114,11	106,67	105,80	117,39	107,82	104,35
3 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	4,9	5,2	5,4	5,4	5,3	4,9	5,4	5,5	5,4	5,4
	Osmolalnost (mOsm/kg)	228	259	221	355	368	244	300	287	356	379
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	101,98	99,08	87,80	94,23	103,51	105,98	109,59	91,36	91,40	91,11
6 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,0	5,2	5,5	5,6	5,4	5,0	5,5	5,6	5,5	5,3
	Osmolalnost (mOsm/kg)	226	258	226	353	372	242	299	289	350	381
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	104,90	95,41	85,37	90,38	94,74	103,26	109,59	103,70	104,84	91,67
12 m.	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,1	5,1	5,4	5,5	5,3	5,0	5,4	5,5	5,4	5,4
	Osmolalnost (mOsm/kg)	229	260	222	351	377	243	303	292	352	385
	Sadržaj aktivne supstance (%) [#]	94,01	98,90	108,70	98,46	107,63	101,90	104,93	92,10	97,04	100,83

^{*}u odnosu na deklarirani sadržaj (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

[#]u odnosu na inicijalnu vrednost (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

Tabela 4.17. Vrednosti ispitivanih parametara za kapi za oči pre i posle sprovedenih šest cikličnih izmena temperature

V. int	Parametar	Oznaka uzorka									
		F1OLO	F2OLO	F3OLO	F4OLO	F5OLO	F1KF	F2KF	F3KF	F4KF	F5KF
Inicijalno	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	5,0	5,2	5,6	5,6	5,3	5,0	5,5	5,6	5,4	5,5
	Osmolalnost (mOsm/kg)	227	261	219	359	378	246	302	291	357	385
	Sadržaj aktivne supstance (%) [*]	107,21	106,15	111,02	101,13	111,06	108,41	102,03	98,55	99,71	95,94
	Viskozitet (na 25 1/s)	81,7	77,6	95,3	77,2	94,2	84,7	81,4	80,8	81,4	56,2
Posle TC	Izgled i bistrina	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar	Bistar
	pH	4,8	5,2	5,5	5,5	5,3	4,8	5,2	5,4	5,5	5,3
	Osmolalnost (mOsm/kg)	224	261	219	359	388	244	303	287	353	383
	Sadržaj aktivne supstance (%) [*]	93,46	108,49	102,70	109,90	100,00	98,40	102,84	104,41	103,49	108,46
	Viskozitet (na 25 1/s)	81,2	81,0	97,3	80,1	52,6	88,2	83,1	81,8	80,9	67,5

^{*}u odnosu na deklarisanu sadržaj (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

[#]u odnosu na inicijalnu vrednost (prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja; koeficijenti varijacije bili su manji od 5%)

Na kraju perioda čuvanja ispitivanih formulacija kapi za oči pri ambijentalnim uslovima (tabela 4.15) i pri temperaturi 2–8 °C (tabela 4.16) nisu primećene promene u izgledu i bistrini, poput pojave zamućenosti, precipitacije polimera ili lekovitih supstanci.

Takođe, nisu uočene značajnije promene pH vrednosti i osmolalnosti ispitivanih kapi za oči čuvanih pri ambijentalnim uslovima u odnosu na inicijalne vrednosti (tabela 4.15). Promene pH vrednosti bile su u opsegu svega $\pm 3\%$ u odnosu na inicijalne vrednosti, dok su promene osmolalnosti bile u opsegu $\pm 2\%$. Slično tome, izmerene vrednosti pH i osmolalnosti, nakon godinu dana čuvanja pri temperaturi 2–8 °C nisu bile značajno različite od inicijalnih vrednosti (tabela 4.16).

Rezultati merenja viskoziteta ispitivanih uzoraka nisu pokazali značajne promene u vrednosti posmatranog parametra u toku perioda ispitivanja pri ambijentalnim uslovima (tabela 4.15). Izvesne promene uočene su samo kod vrednosti viskoziteta uzoraka F4KF i F5KF što se može objasniti relaksacijom polimernih lanaca i starenjem polimera u formulacijama [213]. Na kraju perioda testiranja, sve formulacije su imale vrednosti viskoziteta koje se nalaze u preporučnom opsegu za oftalmološke preparate (tabela 4.15).

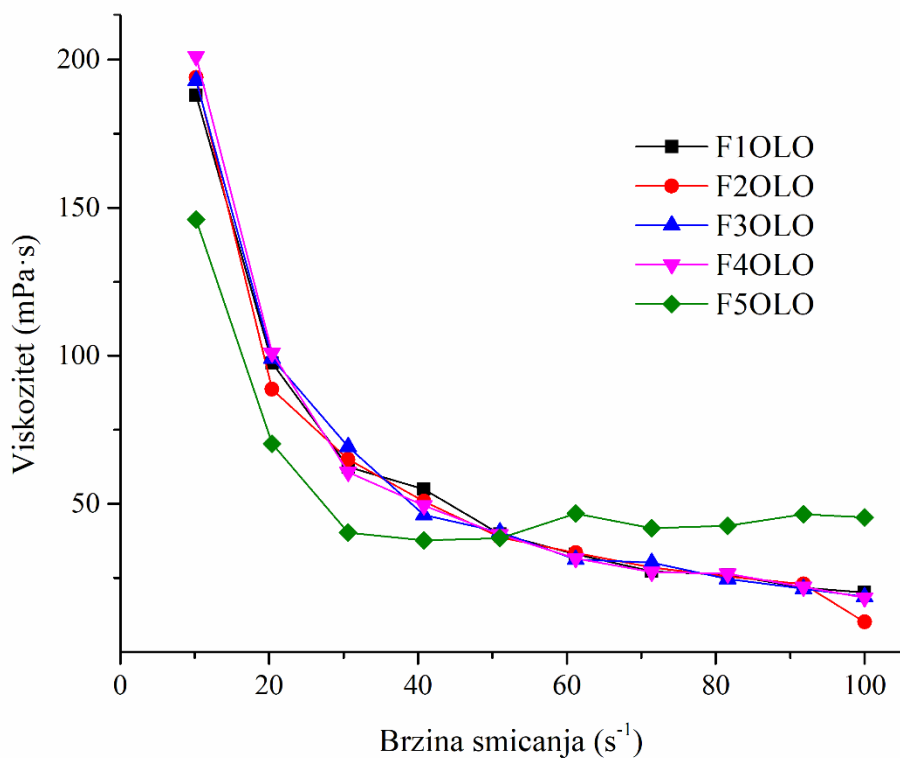
Sadržaj OLO nakon perioda od godinu dana čuvanja pri ambijentalnim uslovima nalazio se u opsegu 90,00–98,11% (tabela 4.15), što je u skladu sa zahtevima USP monografije *Olopatadine Hydrochloride Ophthalmic Solution* (min. 90,0% i max. 110,0% od deklarisanе količine olopatadina) [93]. U uzorcima čuvanim pri temperaturi 2–8 °C, sadržaj OLO nalazio se u opsegu 94,01%–108,70% (tabela 4.17), što je takođe u skladu sa zahtevima USP monografije.

Sa druge strane, sadržaj KF nakon 12 meseci čuvanja pri ambijentalnim uslovima nalazio se u opsegu 92,33–99,7% (tabela 4.15), u odnosu na početne vrednosti. Nakon čuvanja na 2–8 °C, sadržaj KF nalazio se u opsegu 92,10–104,93% (tabela 4.16). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su sve ispitivane formulacije bile stabilne pri navedenim uslovima ispitivanja.

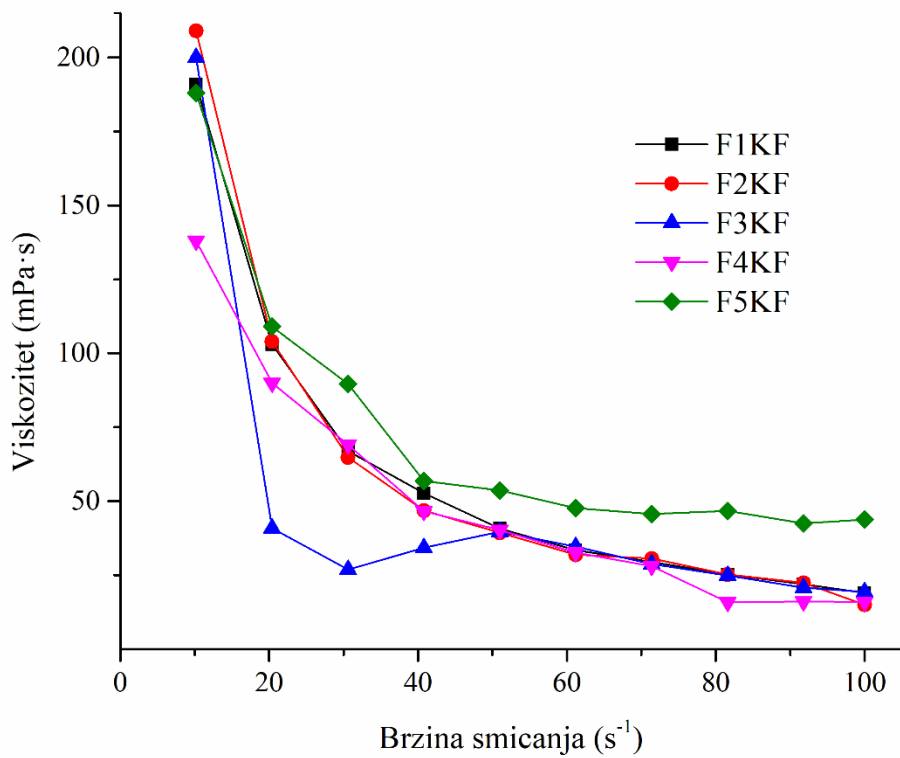
Nakon sprovedenih šest ciklusa izmene temperature od 2–8 °C do 45°C sa zadržavanjem na svakoj temperaturi ne kraće od 48 h, izgled, bistrina i boja svih ispitivanih formulacija je ostala nepromenjena (tabela 4.17). Slično prethodnim uslovima čuvanja promene pH vrednosti su se kretale unutar intervala $\pm 3\%$, a osmolalnosti $\pm 2\%$ u odnosu na izmerene početne vrednosti. Merenje viskoziteta pre i posle sprovođenja cikličnih izmena temperature ukazuje na neznatne promene u vrednostima prividnih viskoziteta izuzev kod formulacija F5OLO i F5KF, dok su sve formulacije zadržale „shear thinning“ tip proticanja (slika 4.21). Takođe, sadržaj lekovitih supstanci bio je u prihvatljivom opsegu: 93,46–109,9% (OLO) i 98,40–108,46% (KF).

Na osnovu sprovedenih studija stabilnosti, može se zaključiti da su formulisane kapi za oči pokazale zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost pri svim uslovima čuvanja.

a)



b)

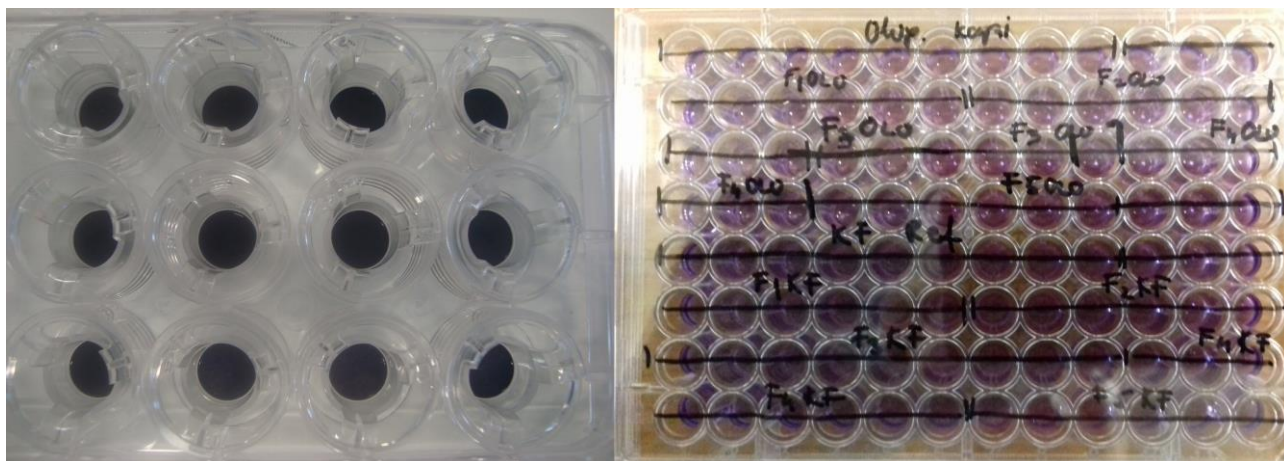


Slika 4.21. Krive viskoziteta ispitivanih formulacija kapi za oči sa a) OLO i b) KF nakon sprovedenih šest ciklusa izmene temperature

4.3 REZULTATI TREĆE FAZE EKSPERIMENTALNOG RADA

4.3.1 Procena biokompatibilnosti ispitivanih formulacija

Procena biokompatibilnosti formulisanih kapi za oči sa OLO i KF izvršena je prema standardnoj proceduri, prethodno opisanoj u literaturi [125]. Ovaj protokol podrazumeva da se MTT test obično izvodi 24 h nakon nanošenja uzorka na apikalnu površinu 3D-HCE-T ćelija. Period postinkubacije odabran je kako bi se omogućio oporavak ćelija u slučaju reverzibilnih citotoksičnih efekata [125]. Test biokompatibilnosti ili druga ispitivanja koja uključuju primenu *in vitro* ćelijskih kultura, obično podrazumevaju nanošenje ispitivanih supstanci ili materijala koji su prethodno razblaženi u medijumu za kultivaciju ćelija ili odgovarajućem puferu [122].

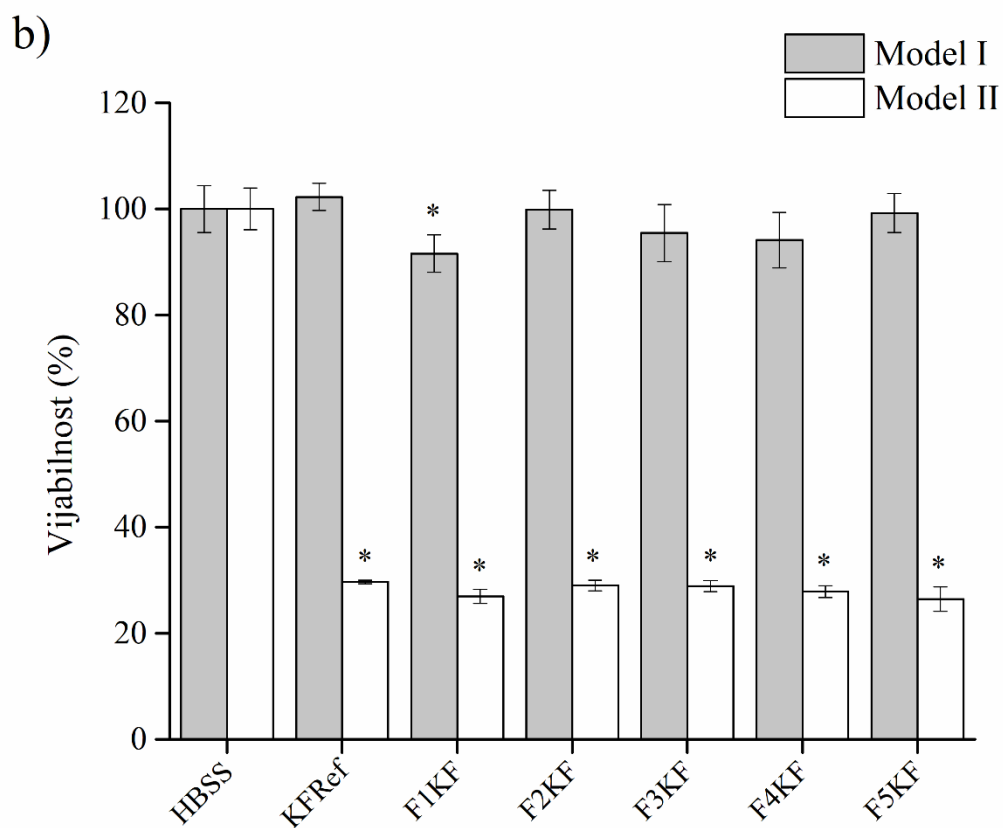
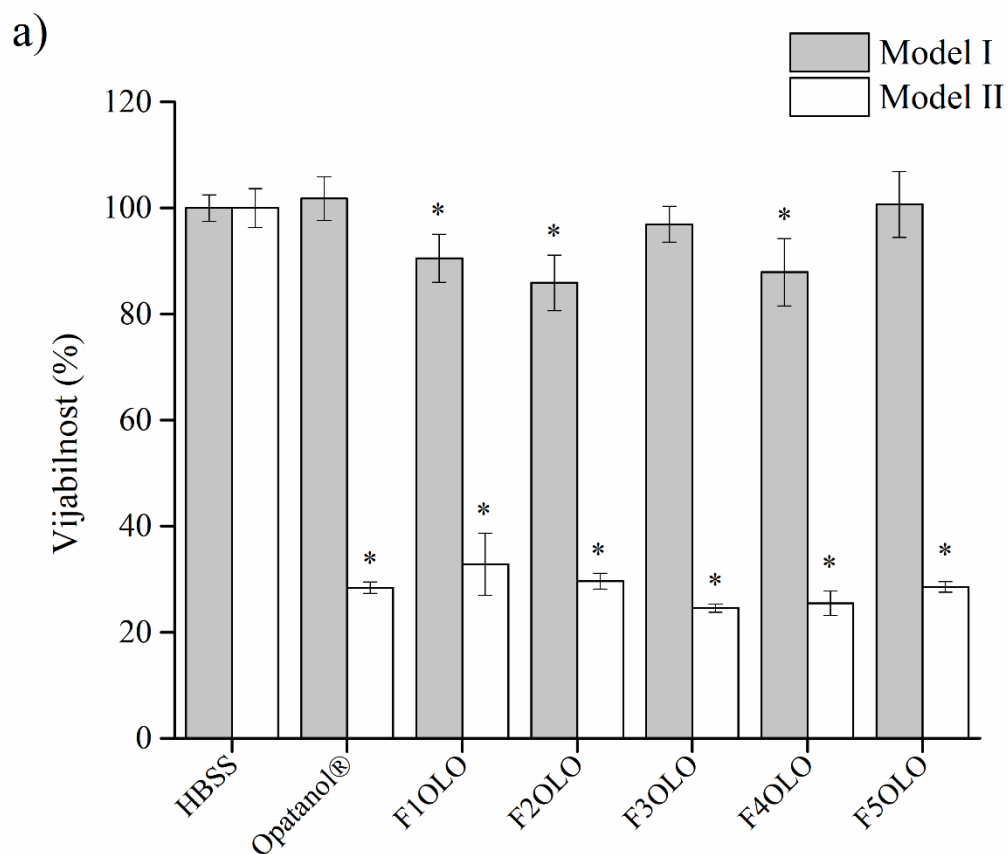


Slika 4.22. MTT nakon redukcije pod dejstvom mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze

Citotoksičnost podrazumeva smanjenje ukupnog broja HCE-T ćelija. Nivo preživljavanja ćelija (vijabilnost) prati se spektrofotometrijskim merenjem sadržaja ljubičasto obojenog rastvora formazana koji nastaje redukcijom MTT-a, čiji je rastvor žuto obojen. Kako do redukcije MTT-a dolazi usled delovanja enzima mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze, samo žive, metabolički aktivne ćelije mogu da izazovu ovaj efekat koji se ogleda u promeni boje u ljubičastu (slika 4.22) [122]. Na osnovu ISO standarda, ispitivana supstanca se smatra biokompatibilnom, ako je vijabilnost ćelija nakon inkubacije > 80% [213, 214].

Na slici 4.23. su prikazani rezultati MTT testa nakon inkubacije HCE-T ćelijskih Modela I i II ispitivanim formulacijama kapi za oči sa OLO (a) i KF (b). Na vijabilnost ćelija značajno je uticala inkubacija sa svim formulacijama, kako ispitivanim, tako i referentnim, kada je za procenu vijabilnosti korišćen Model II, koji je, kao što je ranije navedeno, sačinjen od monosloja epitelnih HCE-T ćelija. Sa druge strane, nakon sprovedenog MTT testa na Modelu I kojeg čine epitelne HCE-T ćelije poređane u više slojeva, sve ispitivane formulacije pokazale su zadovoljavajuću vijabilnost ćelija (> 80%).

U slučaju formulacija koje sadrže OLO (slika 4.23a), došlo je do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija nakon njihovog izlaganja formulacijama F2OLO ($85,9 \pm 5,3\%$, $n = 6$) i F4OLO ($87,9 \pm 6,3\%$, $n = 6$). Nešto niže smanjenje vijabilnosti ćelija, ali i dalje statistički značajno različito od kontrolne grupe inkubirane u HBSS-u ($p < 0,05$) zapaženo je nakon inkubacije ćelija sa formulacijom F1OLO ($90,5 \pm 4,5\%$, $n = 9$). Razlika u vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolu, nije bila statistički značajna ($p > 0,05$) nakon inkubacije ćelija sa formulacijama F3OLO i F5OLO ($96,9 \pm 3,4\%$, $n = 9$; $100,7 \pm 6,2\%$, redom).



Slika 4.23. Vijabilnost (%) HCE-T ćelijskih Modela I i II određena primenom MTT testa, 24 h nakon eksperimenata permeabilnosti formulacija sa a) OLO i b) KF. Čelije inkubirane u HBSS pH 5,5 su korišćene kao kontrola 100% vijabilnosti. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$ u porećenju sa kontrolom

Interesantno je da je preživljavanje ćelija u većem procentu bilo nakon inkubacije sa formulacijama najslabijeg sastava, tj. formulacijama OLO koje su sadržavale kombinacije dva polimera u odnosu na formulacije koje su u svom sastavu imale pojedinačne polimere. Kombinacije polimera MMW CS i HP GG, te HP GG i NH, pokazale su niži citotoksični potencijal, odnosno potpuno odsustvo citotoksičnosti, u odnosu na svaki polimer individualno.

Visok nivo vijabilnosti HCE-T ćelija postignut je nakon inkubacije sa formulacijama kapi za oči sa KF ($91,6 \pm 3,5\%$ – $99,9 \pm 3,6\%$). Vijabilnost ćelija se značajno razlikovala ($p < 0,05$) u odnosu na vijabilnost kontrolne grupe ćelija, samo nakon inkubacije sa formulacijom F1KF ($91,6 \pm 3,5\%$, $n = 6$), ali i dalje je imala zadovoljavajuću vrednost ($> 80\%$). Slično prethodnim rezultatima, veoma nizak citotoksični potencijal pokazale su formulacije koje su u svom sastavu imale kombinacije polisaharidnih polimera, $95,5 \pm 3,6\%$ ($n = 6$) za F3KF, odnosno $99,2 \pm 3,7\%$ ($n = 6$) za F5KF.

Zadovoljavajuće nizak citotoksični efekat korišćenih polisaharidnih polimera u saglasnosti je sa ranijim rezultatima predstavljenim u literaturi. *In vitro* (HCE ćelije rožnjače i NHC-IOBA ćelije konjunktive) i *in vivo* studije u kojima su ispitivane različite formulacije u kojima je kao mukoadhezivni polimer korišćen hitozan, pokazale su odsustvo iritacije ili vidljivih nepoželjnih promena u morfologiji epitela rožnjače ili konjunktive [32, 215]. Takođe, zadovoljavajuća vijabilnost ćelija dobijena je nakon tretiranja modela epitela rožnjače baziranog na CEPI 17 ćelijskoj liniji, veštačkim suzama koje su sadržavale HP GG [54]. Višestruka pozitivna svojstva NH, odnose se ne samo na visok stepen hidratacije, lubrikacije i izražene mukoadhezivne karakteristike, nego i na dobru podnošljivost i odsustvo mogućih neželjenih iritacionih ili citotoksičnih efekata, što je potvrđeno većim brojem *in vitro* i *in vivo* studija [49, 216, 217]. Primenom formulacija koje su sadržavale različite koncentracije NH na 3D model zasnovan na ARPE-19 ćelijskoj liniji, ili na izolovane epitelne ćelije svinjske rožnjače, dobijeni nivo vijabilnosti prelazio je 100% što se objašnjava boljim uslovima za proliferaciju ćelija zbog velike sposobnosti polimera da zadržava vodu [49, 173].

Dobijeni rezultati studije biokompatibilnosti sprovedene na jednom i drugom ćelijskom modelu su u potpunosti različiti (slika 4.23). Može se zaključiti da je ključni korak za dobijanje tačnih i reproduktivnih rezultata odabir odgovarajućeg *in vitro* ćelijskog modela. Još jednom je potvrđeno da kompleksni višeslojni HCE-T ćelijski model (Model I) uspešno oslikava stvarne fiziološke karakteristike površine oka [199]. Uzimajući u obzir činjenicu da Model II predstavlja samo ograničeni deo tkivne strukture, čineći ga tako izuzetno osetljivim modelom, njegova podložnost citotoksičnosti ne može da osigura dobijanje relevantnih rezultata. Ovom zaključku u prilog ide i izrazito visoka citotoksičnost komercijalnih preparata kapi za oči sa OLO i KF (vijabilnost ćelija $< 30\%$). Zbog toga, prilikom korišćenja Modela II u različitim studijama, ispitivane formulacije koje se bezbedno mogu primeniti, moraju biti razblažene u odnosu na primenu u *in vivo* sistemu [173, 218].

Sa druge strane, vijabilnost ćelija tretiranih komercijalnim kapima za oči sa OLO ($101,8 \pm 4,1\%$, $n = 9$), odnosno sa KF ($102,3 \pm 2,6\%$, $n = 9$) ukazuje na veliki značaj Modela I kao relevantne alternativne metode za procenu biokompatibilnosti novih formulacija oftalmoloških preparata u ranim fazama razvoja.

4.3.2 Rezultati *in vivo* studije procene efikasnosti formulisanih kapi za oči

Dobijeni rezultati fizičko-hemijske karakterizacije, te studija permeabilnosti i biokompatibilnosti ukazali su na povoljne karakteristike formulacija koje sadrže kombinacije polimera, MMW CS i HPGG (F3OLO i F3KF), odnosno kombinaciju HPGG i NH (F5OLO i F5KF). Odgovarajuće fizičko-hemijske i funkcionalne osobine, izražen sinergizam kombinacije polimera na reološke i mukoadhezivne karakteristike, odsustvo citotoksičnosti, bili su osnovni kriterijumi za odabir formulacija za pretkliničku *in vivo* studiju procene efikasnosti u suzbijanju svraba i potencijalno bola izazvanih primenom histamina na oku miševa.

Studija je sprovedena primenom testa svraba oka u kojem se histamin koristi kao pruritogen (paradigma akutnog alergijskog konjunktivitisa), za koji je poznato da ima dobru translacionu vrednost za ispitivanja na površini oka imajući u vidu sličnosti sa humanom okularnom patologijom,

ali i neinvazivnost i niske troškove izvođenja [129, 219]. Za ispitivanje alergijskog konjunktivitisa trenutno se najčešće preporučuju miševi (uključujući i C57BL/6 soj), zbog čega je studija izvedena upravo na ovom animalnom subjektu [134, 220].

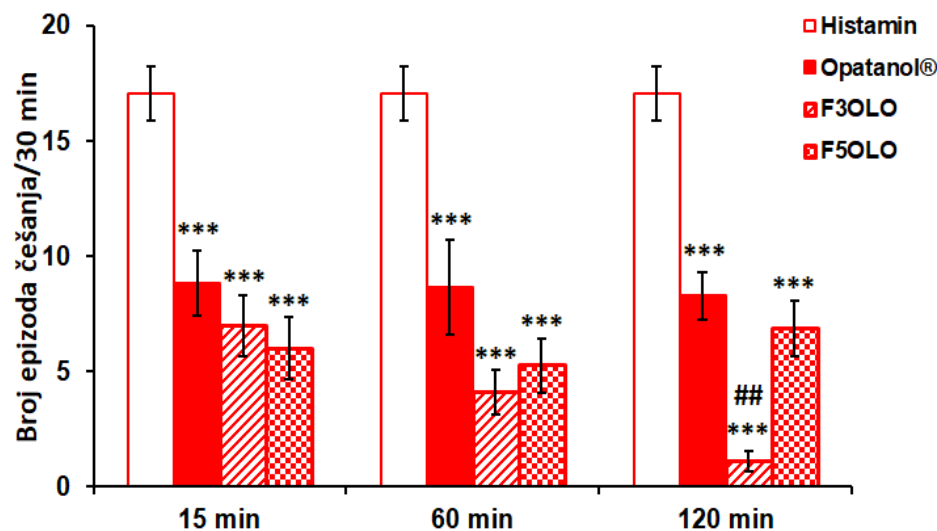
Primenjeni histamin u donju konjunktivalnu vrećicu miševa, indukovao je specifičan bihevioralni odgovor, koji je kvantifikovan kao $17,1 \pm 1,2$ epizoda češanja i $11,15 \pm 1,1$ epizoda trljanja zadnjom i prednjom ipsilateralnom šapom, redom (slike 4.24 i 4.25). Rastvarač za histamin (PBS) izazvao je minimalan broj češanja/brisanja pokreta (nije prikazano). Skup brzih pokreta zadnjom šapom kao odgovor na ukapavanje histamina, smatra se senzacijom svraba kod glodara što bi bila paradigma oslobađanja histamina iz imunoloških ćelija konjunktive u alergijskom konjunktivitisu kod ljudi. Svrab koji se javlja na oku je patognomonični simptom alergijskog konjunktivitisa, ali i osećaj bola može biti prisutan ili izazvan snažnim grebanjem rožnjače koja je izuzetno osetljiva na bolne podražaje [129]. Nociceptivno ponašanje se manifestuje kod glodara blagim pokretima trljanja oka prednjom ipsilateralnom šapom, ali je manje izraženo u poređenju sa ponašanjem koje odražava senzaciju svraba. Dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim podacima o svrabu i blagim nociceptivnim senzacijama koje proizvodi jonoforetski primenjeni histamin kod ljudi [221].

Da bi se ispratio uticaj kombinacija polimera kao nosača na intenzitet i dužinu trajanja antipruritusnog i antinociceptivnog dejstva okularnih antihistaminika, svi tretmani su aplikovani u tri vremenske tačke, 15, 60 i 120 minuta pre ukapavanja histamina. Obe ispitivane formulacije kapi za oči sa OLO, kao i komercijalni preparat (Opatanol[®]) ostvarili su statistički značajno smanjenje epizoda češanja (Opatanol[®]: $8,9 \pm 1,4$, $8,7 \pm 2$ i $8,3 \pm 1$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom; F3OLO: $7 \pm 1,3$, $4,1 \pm 1$ i $1,1 \pm 0,4$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom; F5OLO: $6 \pm 1,3$, $5,3 \pm 1,2$ i $6,9 \pm 1,2$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom) i trljanja (Opatanol[®]: $6,3 \pm 0,6$, $5,8 \pm 0,8$ i $5,1 \pm 0,6$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom; F3OLO: $4 \pm 0,3$, $6 \pm 0,5$ i $3,9 \pm 0,6$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom; F5OLO: $4,6 \pm 0,8$, $4,9 \pm 1,2$ i $6 \pm 0,9$ nakon 15, 60 i 120 minuta, redom) kod miševa. Ispitivane formulacije kapi za oči sa OLO ostvarile su izraženije antipruritusno dejstvo u odnosu na komercijalni preparat, s tim da je statistički značajna razlika zabeležena samo kod F3OLO (primenjen 120 min pre ukapavanja histamina) (slika 4.24a). Antinociceptivno dejstvo novoformulisanih okularnih preparata je bilo izraženije (15 min) ili poredbeno (60 i 120 min) sa komercijalnim preparatom (slika 4.24b).

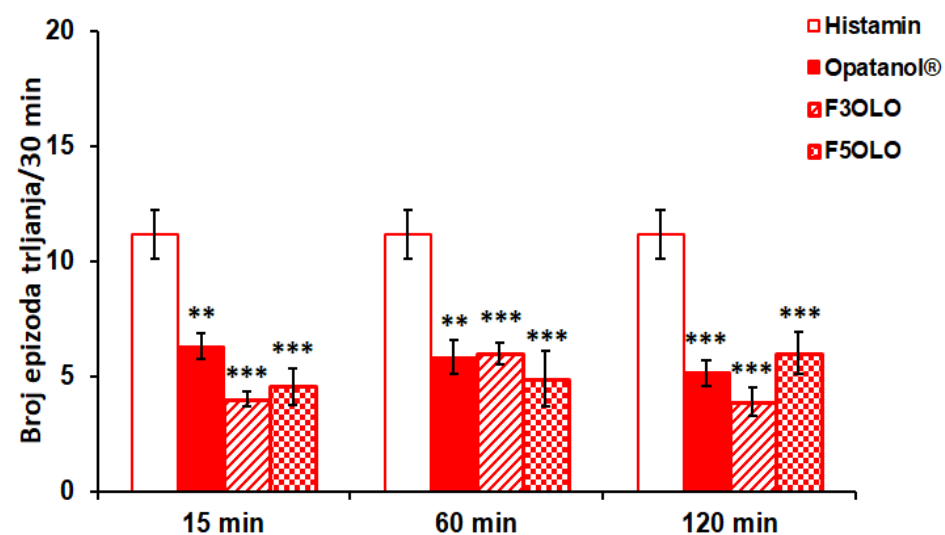
Sve formulacije KF (ispitivane i referentna) pokazale su statistički značajan antipruritusni i antinociceptivni efekat. Odgovarajuće srednje vrednosti epizoda češanja iznose: $9,6 \pm 1$ (15 min), $13 \pm 2,9$ (60 min) i $13,3 \pm 2,7$ (120 min) za KRef; $9,7 \pm 1,5$ (15 min), $6,1 \pm 1,1$ (60 min) i $2,9 \pm 1$ (120 min) za F3KF; $2,8 \pm 1,4$ (15 min), $4,1 \pm 1$ (60 min) i $4,6 \pm 0,8$ (120 min) za F5KF. Odgovarajuće srednje vrednosti epizoda trljanja iznose: $5,4 \pm 1$ (15 min), $7,3 \pm 1,1$ (60 min) i $8 \pm 1,2$ (120 min) za KRef; $5,1 \pm 0,4$ (15 min), $4,8 \pm 0,7$ (60 min) i $3,8 \pm 0,7$ (120 min) za F3KF; $3,8 \pm 0,4$ (15 min), $5,8 \pm 0,6$ (60 min) i $3,6 \pm 0,7$ (120 min) za F5KF. Obe kombinacije polimera su značajno potencirale intenzitet i dužinu trajanja antipruritusnog dejstva KF, što se može zaključiti na bazi postojanja statistički značajne razlike u broju epizoda češanja između novih i komercijalne okularne formulacije u sve tri vremenske tačke, kao i opadanja efikasnosti komercijalnog preparata po primeni 60 i 120 min pre ukapavanja histamina (slika 4.25a). Sličan odgovor, ali manje izražen, zabeležen je i pri praćenju antinociceptivnog efekta ispitivanih formulacija KF (slika 4.25b).

Kombinacije polimera korišćene u pripremi novih okularnih formulacija OLO i KF su zahvaljujući povećanju viskoziteta i mukoadhezivnim svojstvima doprinele dužem zadržavanju i produženom vremenu isporuke lekovite supstance usled čega je zabeleženo duže trajanje antipruritusnog dejstva, posebno kod formulacija sa KF. Dodatno, biopolimeri su verovatno doprineli poboljšanoj penetraciji lekovitih supstanci do mesta delovanja, usled čega je zabeleženo potenciranje pre svega antipruritusnog dejstva, takođe naglašenije kod formulacija sa KF. Zabeležena antinociceptivna svojstva koja su naglašenija kod novih formulacija OLO i KF mogla bi da budu od potencijalnog kliničkog značaja u smislu smanjenja incidencije/intenziteta bola u oku, koji se prijavljuje kao jedno od najčešćih neželjenih efekata komercijalnih preparata ovih okularnih antihistaminika.

a)

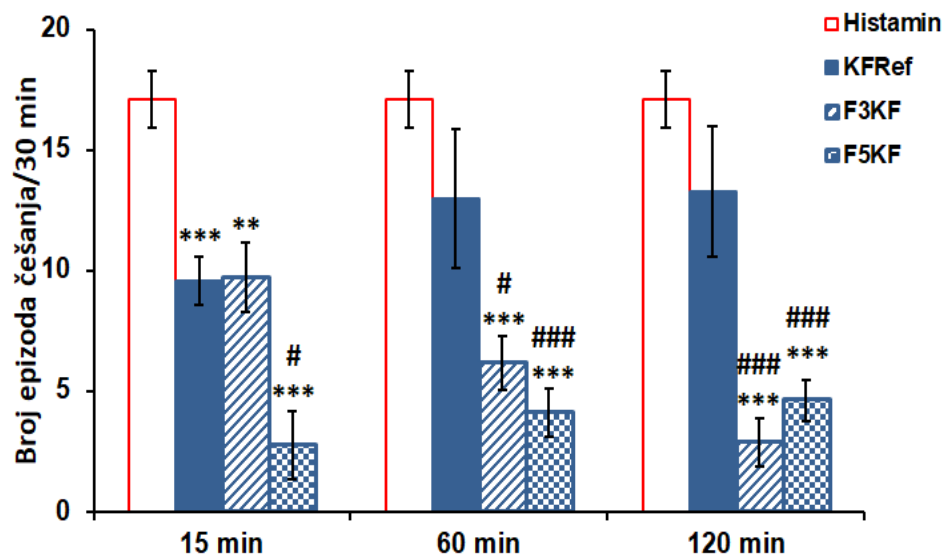
Antipruritusno dejstvo

b)

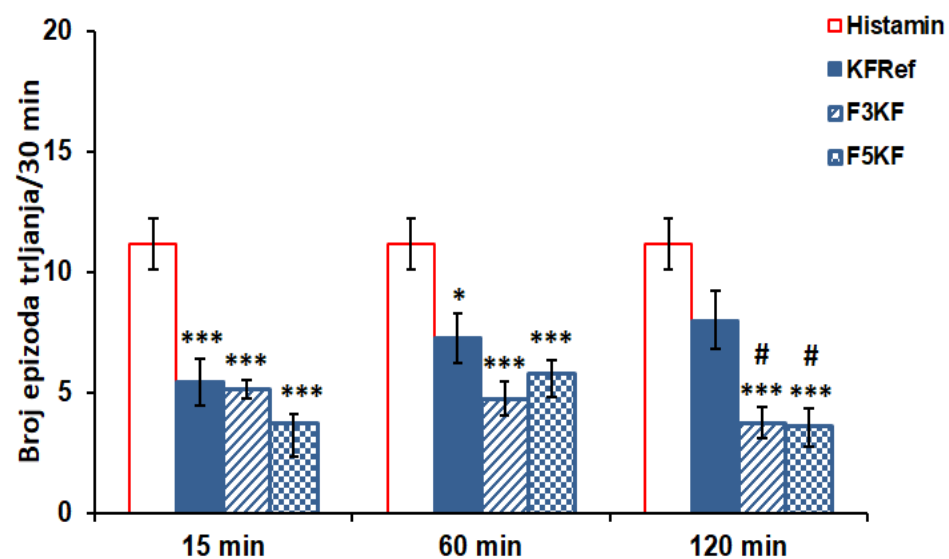
Antinociceptivno dejstvo

Slika 4.24. Efekti kapi za oči sa olopatadinom (OLO), referentni preparat Opatanol® i odabrane nove formulacije F3OLO i F5OLO, na histaminom-izazvano a) češanje i b) trljanje oka miševa zadnjom i prednjom šapom, redom. Kolone predstavljaju srednju vrednost grupe \pm statistička greška srednje vrednosti ($n = 7-13$). Statistička analiza je sprovedena primenom dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćenom Tukey *post hoc* testom (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; ## $p < 0,01$ u poređenju sa referentnom formulacijom)

a)

Antipruritusno dejstvo

b)

Antinociceptivno dejstvo

Slika 4.25. Efekti kapi za oči sa ketotifenom (KF), referentni preparat KRef i odabrane nove formulacije F3KF i F5KF, na histaminom-izazvano a) češanje i b) trljanje oka miševa zadnjom i prednjom šapom, redom. Kolone predstavljaju srednju vrednost grupe \pm statistička greška srednje vrednosti ($n = 7-13$). Statistička analiza je sprovedena primenom dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) praćenom Tukey *post hoc* testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ u poređenju sa kontrolnom grupom; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ u poređenju sa referentnom formulacijom)

5. ZAKLJUČAK

Zaključak prve faze eksperimentalnog rada

- U toku preliminarne faze ispitivanja odabran je najpogodniji postupak izrade vehikuluma za oftalmološku primenu sa različitim polisaharidnim ugušćivačima: hidroksietilceluloza (HEC), hipromeloza/hidroksipropilmetilceluloza (HPMC), niskomolekulski i srednjemolekulski hitozan (LMW CS i MMW CS), hidroksipropil guar guma (HP GG) i natrijum-hijaluronat (NH). Postupak izrade podrazumevao je pripremu osnovnih rastvora polimera mešanjem odgovarajuće količine polimera u delu prečišćene vode. Završna faza izrade vehikuluma podrazumevala je podešavanje pH vrednosti za vehikulume koji sadrže hitozan u opsegu 5,5–5,9, a za preostale vehikulume u opsegu 6,6–7,4. U eksperimentalnu fazu uključeno je ukupno 14 vehikuluma koji su u svom sastavu imali jedan ili kombinaciju dva polimera iz grupe derivata celuloze (HPMC i HEC), potom hitozan (LMW i MMW), NH i HP GG.
- Na osnovu ispitivanja fizičko-hemijskih i funkcionalnih karakteristika vehikuluma sa polisaharidnim polimerima, izvršena je selekcija vehikuluma koji su imali odgovarajuće osobine za oftalmološke preparate. Dobijeni rezultati ukazali su na postojanje sinergističkog efekta polimera na viskozitet, reološke i mukodhezivne karakteristike, koji omogućava upotrebu izrađenih vehikuluma kao lubrikanasa u otklanjanju simptoma sindroma suvog oka.
- U preliminarnim fazama istraživanja, izvršeno je merenje molekulskih masa korišćenih polimera. Dobijeni rezultati su pokazali da HP GG ima znatno nižu molekulsku masu od MMW CS, a izrazito viši doprinos viskozitetu vehikuluma.
- U ovoj fazi je izvršena procena izgleda i bistrine, kao kritičnih parametara u proceni kvaliteta oftalmoloških preparata i zaključeno je da su vehikulumi sa višim procentima HP GG ($\geq 0,5\%$, m/V) bili blago do potpuno opalescentni i beličasto obojeni i zbog toga su isključeni iz daljih ispitivanja. Preostali vehikulumi su zadovoljavali navedene parametare kvaliteta.
- Reološkom karakterizacijom izvršena je procena uticaja pojedinačnih polimera na viskozitet vehikuluma. Izvršen je odabir odgovarajućih koncentracija pojedinačnih polimera koji su korišćeni u kombinacijama (HEC-HP GG, MMW CS-HP GG, NH-HP GG). Sve ispitivane kombinacije polimera pokazale su pozitivan reološki sinergizam. Izmerene vrednosti prividnih viskoziteta vehikuluma koji su u svom sastavu imali dva polimera bile su značajno više u odnosu na vehikulume koji su sadržavali pojedinačne polimere u odgovarajućim koncentracijama. Pored toga, ispitivani vehikulumi su pokazali vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje koje karakteriše nizak viskozitet pri višim brzinama smicanja i viši viskozitet pri nižim brzinama smicanja. Vehikulumi odgovarajućeg viskoziteta, poseduju svojstvo dužeg zadržavanja preparata na mestu primene i zahvaljujući svojstvima upotrebljenih polimera, očekuje se da će ispoljiti lubrikantni efekat.
- U ovoj fazi izvršena je i procena reološkog ponašanja ispitivanih vehikuluma u simuliranim fiziološkim uslovima, mešanjem sa veštačkom suznom tečnošću. Svi vehikulumi su zadržali vremenski zavisno proticanje. Kod većine vehikuluma došlo je do značajnog sniženja vrednosti viskoziteta nakon razblaženja. Do statistički značajnog povećanja vrednosti prividnih viskoziteta došlo je kod vehikuluma koji su u svom sastavu imali HP GG, odnosno NH. Analogno ponašanje uočeno je kod komercijalnih preparata (Systane Ultra[®] Lubricant i Proculin[®] Tears) sa polimerima iz iste grupe, ali bez statistički značajnog povećanja viskoziteta.
- Nakon sprovedene sterilizacije parom (15 minuta na 121 °C i 101,3 kPa) ispitivanih oftalmoloških vehikuluma, rezultati fizičko-hemijske karakterizacije ukazali su da ovo nije pogodna metoda sterilizacije. Istovremeni uticaj toplote i zasićene vodene pare uzrokovao je značajne promene u vrednostima prividnih viskoziteta, verovatno zbog uticaja na strukturu polimera. Dodatno, sprovedeni proces sterilizacije je uticao na bistrinu vehikuluma sa hitozanom.

- Preliminarno ispitivanje stabilnosti izrađenih vehikuluma u trajanju od 28 dana, koji predstavlja uobičajeni rok upotrebe oftalmoloških preparata nakon otvaranja, ukazalo je na zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost bez značajnih promena u izgledu, bistrini, pH vrednosti vehikuluma i tipu tečenja, ali sa promenama vrednosti prividnih viskoziteta vehikuluma u odnosu na inicijalne vrednosti, pri čemu promene nisu bile značajne kod svih vehikuluma (V13).
- Ispitivanjem uticaja odabranih polimera na površinsku aktivnost, utvrđeno je da HP GG i NH pokazuju izvestan sinergistički efekat sa upotrebljenim konzervansom (benzalkonijum-hlorid), u snižavanju površinskog napona. Izmerene vrednosti površinskih napona konzervisanih vehikuluma bile su nešto niže od fizioloških vrednosti površinskog napona suznog filma. Ovo predstavlja pogodnu karakteristiku ispitivanih lubrikanasa u smislu ublažavanja simptoma sindroma suvog oka, s obzirom da se ovo stanje povezuje sa povišenim vrednostima površinskog napona na međupovršini vazduh/suzna tečnost.
- Primenom različitih *in vitro* metoda u proceni mukoadhezivnih karakteristika ispitivanih vehikuluma, utvrđen je značaj poznavanja mehanizma interakcije različitih polimera i mucina jer od toga zavisi i odabir odgovarajuće metode ispitivanja. Zbog korišćenja i procene mukoadhezivnih karakteristika različitih polimera, kao i njihovih kombinacija, primenjene su tri različite metode. Reološka metoda procene mukoadhezivnih karakteristika omogućila je određivanje intenziteta i tipa interakcije između ispitivanih polimera i mucina. Oscilatornom reološkom analizom utvrđeno je da dolazi do fizičkog preplitanja polimernih lanaca i glikoproteinskih lanaca mucina i stvaranja slabih vodoničnih veza između ukrštenih lanaca. Najbolje mukoadhezivne karakteristike pokazali su ispitivani vehikulumi sa NH, potom kombinacije HP GG sa MMW CS i HP GG sa NH.
- Na kraju prve faze eksperimentalnog rada, na osnovu dobijenih rezultata, odabrani su vehikulumi sa lubrikantnim svojstvima, odgovarajućih karakteristika za oftalmološke preparate koji su dalje korišćeni za izradu kapi za oči sa model lekovitim supstancama iz grupe antihistaminika. Odabir vehikuluma je izvršen na osnovu bistrine, odgovarajućih vrednosti viskoziteta, sinergističkih reoloških i mukoadhezivnih svojstava. Odabrani vehikulumi sadržavali su kombinacije HP GG (0,25%, m/V) sa MMW CS (0,5%, m/V), odnosno kombinaciju HP GG (0,25%, m/V) sa NH (0,4%, m/V) i navedene pojedinačne polimere u odgovarajućim koncentracijama (ukupno pet različitih vehikuluma).

Zaključak druge faze eksperimentalnog rada

- Na početku druge faze primenom DSC i FTIR tehnika utvrđeno je odsustvo značajnih hemijskih interakcija u fizičkim smešama model lekovitih supstanci (olopatadin i ketotifen) i polimera. Zaključeno je da su odabrane lekovite supstance kompatibilne sa polimerima prisutnim u odabranim vehikulumima. Primećene promene na termogramima fizičkih smeša lekovitih supstanci i polimera, u smislu pomeranja karakterističnih pikova i snižavanje vrednosti entalpija koje odgovaraju topljenju lekovitih supstanci, mogu se pripisati isključivo elektrostatičkim interakcijama između suprotno naelektrisanih funkcionalnih grupa i formiranju vodoničnih veza. Sve navedeno potvrđeno je i analizom FT-IR spektara. Takođe, analiza fizičkih smeša kombinacija polimera pokazala je da nije bilo značajnih interakcija između polimera u smeši koje bi uticale na njihove fizičko-hemijske ili funkcionalne karakteristike, što omogućava njihovo nesmetano kombinovanje u izradi ispitivanih formulacija.
- Analizom rezultata dobijenih merenjem površinskog napona, ugla kvašenja i računanjem koeficijenta rasprostiranja, zaključeno je da će sve formulacije pokazati lakše kvašenje i brže rasprostiranje na površini rožnjače u odnosu na referentne formulacije. Niže vrednosti površinskog napona, ugla kvašenja i posledično više vrednosti koeficijenta rasprostiranja u

odnosu na referentne formulacije, ukazuju na dobra svojstva rasprostiranja. Izuzetak predstavlja formulacija koja sadrži kombinaciju HP GG i NH, za koju se smatra da se nešto sporije rasprostire zbog višeg viskoziteta, ali mukoadhezivna svojstva i viši viskozitet će omogućiti duže zadržavanje ove formulacije na površini oka i produžen kontakt lekovite supstance sa površinom oka.

- Primenom različitih savremenih ćelijskih (HCE-T) i bezćelijskih (PAMPA) modela uspešno je izvršena procena permeabilnosti model lekovitih supstanci kroz ćelijske membrane. Svi primenjeni modeli do sada nisu korišćeni za sličan tip formulacija, tako da je u početnim fazama ispitivanja permeacije izvršeno niz preliminarnih studija kako bi se utvrdili optimalni uslovi ispitivanja u pogledu potrebnog razblaženja formulacija, vremena inkubacije i ispitivanja, posebno na veoma osetljivim ćelijskim modelima zasnovanim na ćelijskoj liniji humanih epitelnih ćelija rožnjače.
- Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da su odabrani odgovarajući uslovi ispitivanja jer su rezultati bili uporedivi sa prethodno dobijenim rezultatima na istim modelima. Više vrednosti koeficijenta permeacije očekivano su dobijene za KF (red veličine 10^{-5} cm/s) u odnosu na OLO (red veličine 10^{-7} cm/s) na svim modelima, zahvaljujući izraženijem lipofilnom karakteru ove lekovite supstance. Na svim modelima formulacije sa hitozanom su imale više koeficijente permeacije u slučaju obe model supstance, najverovatnije zbog uticaja hitozana na slabljenje čvrstih veza između HCE-T epitelnih ćelija i interakcije hitozana sa fosfolipidima ćelijske membrane, što je dovelo do poboljšanja penetracije lekovitih supstanci.
- Formulacije ispitivanih kapi za oči bez hitozana u sastavu, imale su slične ili niže koeficijente permeacije u odnosu na referentne formulacije. Pretpostavlja se da su adhezivna svojstva ovih polisaharida dovela do poboljšanja barijernih funkcija epitela, što je usporilo penetraciju lekovitih supstanci kroz model rožnjače. Doprinos navedenih polimera u poboljšanju okularne raspoloživosti ogleda se više u njihovim mukoadhezivnim svojstvima i omogućenom produženom zadržavanju preparata na mestu primene, nego u uticaju na penetraciju.
- Na osnovu dobijenih rezultata za prividne koeficijente permeacije ($35,9-81,1 \times 10^{-7}$ za OLO i $13,7-25,0 \times 10^{-5}$ za KF), primena PAMPA testa se može smatrati korisnom tehnikom predviđanja permeabilnosti lekovitih supstanci kroz rožnjaču u ranim fazama razvoja oftalmoloških preparata.
- Rezultati studije stabilnosti koja je sprovedena u trajanju od godinu dana pri različitim uslovima čuvanja ispitivanih formulacija (temperature: $2-8^{\circ}\text{C}$ i $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), pokazali su da su sve ispitivane formulacije imale zadovoljavajuću fizičko-hemijsku stabilnost. Dodatno, ispitivanje stabilnosti ubrzanim testom (tzv. stres studija) sprovedena cikličnim izmenama temperature, potvrdila je dobijene rezultate dugoročnog ispitivanja stabilnosti.

Zaključak treće faze eksperimentalnog rada

- Studije biokompatibilnosti sprovedene na Modelu I, zasnovanom na HCE-T ćelijskoj liniji, pokazale su zadovoljavajući nivo vijabilnosti ćelija ($> 80\%$) što ukazuje na nizak nivo citotoksičnosti ispitivanih formulacija.
- Vijabilnost ćelija bila je veća nakon inkubacije sa formulacijama najsloženijeg sastava, tj. formulacijama koje su sadržavale kombinacije polimera u odnosu na formulacije koje su u svom sastavu imale pojedinačne polimere. Niži citotoksični potencijal kombinacija polimera MMW CS i HP GG, te HP GG i NH u odnosu na pojedinačne polimere predstavlja još jednu prednost pozitivnog sinergizma, kada se korišćenjem minimalnih koncentracija polimera u kombinaciji postižu maksimalni efekti.

- U *in vivo* studiju procene efikasnosti u suzbijanju simptoma alergijskog konjunktivitisa, izazvanog primenom histamina na oku miševa, uključene su formulacije koje su u sastavu sadržavale kombinacije polisaharidnih polimera. Kao referentne formulacije korišćene su kapi za oči sa OLO i KF dostupne na tržištu, bez polimernih ugušćivača u sastavu. U slučaju OLO, ispitivane formulacije (kombinacije MMW CS-HP GG i NH-HP GG) dovele su do statistički značajnog smanjenja broja epizoda češanja zadnjom (antipruritusno delovanje) i prednjom (antinociceptivno delovanje) šapom, nakon primene histamina u donju konjunktivalnu vrećicu miševa. Izraženije antipruritusno dejstvo u odnosu na komercijalni preparat ostvarila je formulacija OLO koja sadrži kombinaciju MMW CS-HP GG biopolimera, te se nameće kao potencijalno dobar nosač za OLO za okularnu primenu.
- Statistički značajno antipruritusno i antinociceptivno delovanje postignuto je i sa formulacijama KF. U slučaju KF, obe kombinacije polimera su povećale efikasnost i dužinu trajanja antipruritusnog efekta KF, zahvaljujući povećanju viskoziteta i izraženim mukodhezivnim osobinama, ali i povećanju penetracije do mesta delovanja. Na bazi ovih rezultata, obe kombinacije polisaharidnih polimera bi mogle da se razmotre kao potencijalno novi nosači za oftalmološku primenu KF.

6.LITERATURA

- [1] R.T. Addo, *Ocular drug delivery: advances, challenges and applications*, Springer, 2016.
- [2] Y. Bouwman-Boer, V. Fenton-May, P. Le Brun, *Practical Pharmaceutics, An international Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products*, Springer, 2015.
- [3] L. Bye, N. Modi, M. Stanford, *Basic Sciences for Ophthalmology*, OUP Oxford, 2013.
- [4] A.K. Mitra, *Treatise on Ocular Drug Delivery*, Bentham Science Publishers, 2013.
- [5] R.P. Brannigan, V.V. Khutoryanskiy, *Progress and Current Trends in the Synthesis of Novel Polymers with Enhanced Mucoadhesive Properties*, *Macromole bioscience*, 19 (2019) 1900194.
- [6] V.S. Dave, *Formulation approaches for ocular drug delivery*, in: Y. Pathak, V. Sutariya, A.A. Hirani (Eds.) *Nano-Biomaterials For Ophthalmic Drug Delivery*, Springer, 2016: 147-175.
- [7] M. Gibson, *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*, second ed., CRC Press, Boca Raton, 2009.
- [8] D. Kwatra, R.K. Vadlapatla, V. Khurana, D. Pal, A.K. Mitra, *Routes of Ocular Drug Delivery- Conventional vs. Novel Routes*, *Treatise on Ocular Drug Delivery*, 2013.
- [9] D.F. Sweeney, T.J. Millar, S.R. Raju, *Tear film stability: a review*, *Exp. Eye Res.*, 117 (2013) 28-38.
- [10] A. Ludwig, *The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (2005) 1595-1639.
- [11] J.J. Hurwitz, *Anatomy and physiology of tear secretion, The lacrimal system*, Raven Pr, 1996.
- [12] W. Stevenson, S.K. Chauhan, R. Dana, *Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder*, *Arch. Ophthalmol.*, 130 (2012) 90-100.
- [13] M. Hotujac Grgurević, M. Juretić, A. Hafner, J. Lovrić, I. Pepić, *Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 43 (2017) 275-282.
- [14] A. Bron, J. Tiffany, S. Gouveia, N. Yokoi, L. Voon, *Functional aspects of the tear film lipid layer*, *Exp. Eye Res.*, 78 (2004) 347-360.
- [15] T. Velpandian, *Pharmacology of ocular therapeutics*, Springer, 2016.
- [16] V. Gote, S. Sikder, J. Sicotte, D. Pal, *Ocular drug delivery: present innovations and future challenges*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 370 (2019) 602-624.
- [17] I.P. Kaur, M. Kanwar, *Ocular preparations: the formulation approach*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (2002) 473-493.
- [18] I. Rodríguez, J.A. Vázquez, L. Pastrana, V.V. Khutoryanskiy, *Enhancement and inhibition effects on the corneal permeability of timolol maleate: Polymers, cyclodextrins and chelating agents*, *Int. J. Pharm.*, 529 (2017) 168-177.
- [19] N. Dubashynskaya, D. Poshina, S. Raik, A. Urtti, Y.A. Skorik, *Polysaccharides in Ocular Drug Delivery*, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 22.
- [20] G. Sandri, M.C. Bonferoni, P. Chetoni, S. Rossi, F. Ferrari, C. Ronchi, C. Caramella, *Ophthalmic delivery systems based on drug-polymer-polymer ionic ternary interaction: in vitro and in vivo characterization*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 62 (2006) 59-69.
- [21] R. Safdar, A.A. Omar, A. Arunagiri, I. Regupathi, M. Thanabalan, *Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications—A review*, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 49 (2019) 642-659.
- [22] O.L. Lanier, M.G. Manfre, C. Bailey, Z. Liu, Z. Sparks, S. Kulkarni, A. Chauhan, *Review of Approaches for Increasing Ophthalmic Bioavailability for Eye Drop Formulations*, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 22 (2021) 1-16.

- [23] M. Chowhan, J.C. Lang, P. Missel, Ophthalmic preparations, in: Felton, L. (Ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, London, 2012.
- [24] G. Di Colo, Y. Zambito, C. Zaino, M. Sanso, Selected polysaccharides at comparison for their mucoadhesiveness and effect on precorneal residence of different drugs in the rabbit model, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35 (2009) 941-949.
- [25] B. Grassiri, Y. Zambito, A. Bernkop-Schnürch, Strategies to prolong the residence time of drug delivery systems on ocular surface, *Adv. Colloid Interface Sci.*, (2020) 102342.
- [26] S. Dumitriu, *Polymeric biomaterials*, revised and expanded, Crc Press, 2001.
- [27] C.W. Sheskey PJ, Cable CG, *Handbook of pharmaceutical excipients*, 8 ed., Pharmaceutical Press, London, England, 2017.
- [28] B. Čalija, J. Milić, D. Krajišnik, A. Račić, Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biomedicinskim preparatima, *Arh. Farm.*, 63 (2013) 347-364.
- [29] P. Pahuja, S. Arora, P. Pawar, Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers, *Exp. Opin. Drug Deliv.*, 9 (2012) 837-861.
- [30] V. Zargar, M. Asghari, A. Dashti, A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, *Chem. Bio. Eng. Rev.*, 2 (2015) 204-226.
- [31] T. Irimia, C.-E. Dinu-Pîrvu, M.V. Ghica, D. Lupuleasa, D.-L. Muntean, D.I. Udeanu, L. Popa, Chitosan-based in situ gels for ocular delivery of therapeutics: A state-of-the-art Review, *Mar. Drugs*, 16 (2018) 373.
- [32] M. de la Fuente, M. Ravina, P. Paolicelli, A. Sanchez, B. Seijo, M.J. Alonso, Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62 (2010) 100-117.
- [33] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release.*, 100 (2004) 5-28.
- [34] A.E. De Salamanca, Y. Diebold, M. Calonge, C. García-Vazquez, S. Callejo, A. Vila, M.J. Alonso, Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47 (2006) 1416-1425.
- [35] S. Majumdar, A.K. Mitra, Chemical modification and formulation approaches to elevated drug transport across cell membranes, *Exp. Opin. Drug Deliv.*, 3 (2006) 511-527.
- [36] V. Dodane, M.A. Khan, J.R. Merwin, Effect of chitosan on epithelial permeability and structure, *Int. J. Pharm.*, 182 (1999) 21-32.
- [37] H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *Int. J. Food Microbiol.*, 95 (2004) 147-155.
- [38] F.J. Pavinatto, A. Pavinatto, L. Caseli, D.S. dos Santos, T.M. Nobre, M.E. Zaniquelli, O.N. Oliveira, Interaction of chitosan with cell membrane models at the air– water interface, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 1633-1640.
- [39] O. Felt, A. Carrel, P. Baehni, P. Buri, R. Gurny, Chitosan as tear substitute: a wetting agent endowed with antimicrobial efficacy, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 16 (2000) 261-270.
- [40] M.J. Alonso, A. Sánchez, The potential of chitosan in ocular drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 55 (2003) 1451-1463.
- [41] J.M. Unagolla, A.C. Jayasuriya, Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system, *Eur. J. Pharma. Sci.*, 114 (2018) 199-209.

- [42] B. Li, J. Wang, Q. Gui, H. Yang, Drug-loaded chitosan film prepared via facile solution casting and air-drying of plain water-based chitosan solution for ocular drug delivery, *Bioact. Mater.*, 5 (2020) 577-583.
- [43] The European Pharmacopoeia 10th Edition, 2020., Strasbourg: Council of Europe, 2020.
- [44] D.I. Neseem, Ophthalmic delivery of sparfloxacin from in situ gel formulation for treatment of experimentally induced bacterial keratitis, *Drug Test. Anal.*, 3 (2011) 106-115.
- [45] Y. Xu, J. Song, G. Pang, Z. Chen, J. Zhang, X. Lü, Ocular pharmacokinetics of 0.5% pilocarpine with sodium hyaluronate in rabbits, *Chin. J. Ophthalmol.*, 40 (2004) 87-89.
- [46] J.A. Calles, J. Bermúdez, E. Vallés, D. Allemandi, S. Palma, *Polymers in ophthalmology, Advanced Polymers in Medicine*, Springer, 2015: 147-176.
- [47] L. Mengher, K. Pandher, A. Bron, C. Davey, Effect of sodium hyaluronate (0.1%) on break-up time (NIBUT) in patients with dry eyes, *Br. J. Ophthalmol.*, 70 (1986) 442-447.
- [48] P. Aragona, V. Papa, A. Micali, M. Santocono, G. Milazzo, Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye, *Br. J. Ophthalmol.*, 86 (2002) 181-184.
- [49] R. Salzillo, C. Schiraldi, L. Corsuto, A. D'Agostino, R. Filosa, M. De Rosa, A. La Gatta, Optimization of hyaluronan-based eye drop formulations, *Carbohydr. Polym.*, 153 (2016) 275-283.
- [50]
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=browseByLetter.page&Letter=G>
 (poslednji pristup 11. septembar 2021)
- [51] Y. Cheng, K.M. Brown, R.K. Prud'homme, Characterization and Intermolecular Interactions of Hydroxypropyl Guar Solutions, *Biomacromolecules*, 3 (2002) 456-461.
- [52]
https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human
 (poslednji pristup 28. avgust 2021)
- [53]
<https://www.alims.gov.rs/ciril/medicinska-sredstva/pretrazivanje-medicinskih-sredstava/>
 (poslednji pristup 28. avgust 2021)
- [54] J. Ubels, D. Clousing, T. Van Haitsma, B.-S. Hong, P. Stauffer, B. Asgharian, D. Meadows, Pre-clinical investigation of the efficacy of an artificial tear solution containing hydroxypropyl-guar as a gelling agent, *Curr. Eye Res.*, 28 (2004) 437-444.
- [55] Z. Yin, Y. Wang, K. Wang, C. Zhang, The adsorption behavior of hydroxypropyl guar gum onto quartz sand, *J. Mol. Liq.*, 258 (2018) 10-17.
- [56] R. Mafi, R. Pelton, Y. Cui, H. Ketelson, Weak gelation of hydrophobic guar by albumin in simulated human tear solutions, *Biomacromolecules*, 15 (2014) 4637-4642.
- [57] M. Rolando, S. Autori, F. Badino, S. Barabino, Protecting the ocular surface and improving the quality of life of dry eye patients: a study of the efficacy of an HP-guar containing ocular lubricant in a population of dry eye patients, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 25 (2009) 271-278.
- [58] L. Jones, L.E. Downie, D. Korb, J.M. Benitez-del-Castillo, R. Dana, S.X. Deng, P.N. Dong, G. Geerling, R.Y. Hida, Y. Liu, TFOS DEWS II management and therapy report, *Ocul. Surf.*, 15 (2017) 575-628.
- [59] M. Labetoulle, E.M. Messmer, P.-J. Pisella, A. Ogundele, C. Baudouin, Safety and efficacy of a hydroxypropyl guar/polyethylene glycol/propylene glycol-based lubricant eye-drop in patients with dry eye, *Br. J. Ophthalmol.*, 101 (2017) 487-492.

- [60] G. Uccello-Barretta, S. Nazzi, Y. Zambito, G. Di Colo, F. Balzano, M. Sansò, Synergistic interaction between TS-polysaccharide and hyaluronic acid: implications in the formulation of eye drops, *Int. J. Pharm.*, 395 (2010) 122-131.
- [61] S. Wadhwa, R. Paliwal, S.R. Paliwal, S. Vyas, Hyaluronic acid modified chitosan nanoparticles for effective management of glaucoma: development, characterization, and evaluation, *J. Drug Target.*, 18 (2010) 292-302.
- [62] M.C. Bonferoni, P. Chetoni, P. Giunchedi, S. Rossi, F. Ferrari, S. Burgalassi, C. Caramella, Carrageenan–gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57 (2004) 465-472.
- [63] J.C. Pinto-Bonilla, A. del Olmo-Jimeno, F. Llovet-Osuna, E. Hernández-Galilea, A randomized crossover study comparing trehalose/hyaluronate eyedrops and standard treatment: patient satisfaction in the treatment of dry eye syndrome, *Ther. Clin. Risk Manag.*, 11 (2015) 595.
- [64] R. Rangarajan, B. Kraybill, A. Ogundele, H.A. Ketelson, Effects of a hyaluronic acid/hydroxypropyl guar artificial tear solution on protection, recovery, and lubricity in models of corneal epithelium, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 31 (2015) 491-497.
- [65] M. Bhowmik, P. Kumari, G. Sarkar, M.K. Bain, B. Bhowmick, M.M.R. Mollick, D. Mondal, D. Maity, D. Rana, D. Bhattacharjee, Effect of xanthan gum and guar gum on in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on poloxamer-407, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 117-123.
- [66] M.A. Chowhan, H. Chen, Ophthalmic compositions containing a synergistic combination of two polymers, Google Patents, 2011.
- [67] R.V. Moiseev, P.W.J. Morrison, F. Steele, V.V. Khutoryanskiy, Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery, *Pharmaceutics*, 11 (2019).
- [68] P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, R. Gurny, Ocular tolerance of absorption enhancers in ophthalmic preparations, *AAPS Pharm. Sci.*, 4 (2002) 6.
- [69] M.M. Hom, A.L. Nguyen, L. Bielory, Allergic conjunctivitis and dry eye syndrome, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 108 (2012) 163-166.
- [70] A. Leonardi, R.L. Modugno, E. Salami, Allergy and Dry Eye Disease, *Ocul. Immunol. Inflamm.* (2021) 1-9.
- [71] E. Villani, G. Rabbio, P. Nucci, Ocular allergy as a risk factor for dry eye in adults and children, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 18 (2018) 398-403.
- [72] M.A. Lemp, G.N. Foulks, The definition and classification of dry eye disease, *Ocul. Surf.*, 5 (2007) 75-92.
- [73] C. Belmonte, J.J. Nichols, S.M. Cox, J.A. Brock, C.G. Begley, D.A. Bereiter, D.A. Dartt, A. Galor, P. Hamrah, J.J. Ivanusic, TFOS DEWS II pain and sensation report, *Ocul. Surf.*, 15 (2017) 404-437.
- [74] A.J. Bron, C.S. de Paiva, S.K. Chauhan, S. Bonini, E.E. Gabison, S. Jain, E. Knop, M. Markoulli, Y. Ogawa, V. Perez, Tfos dews ii pathophysiology report, *Ocul. Surf.*, 15 (2017) 438-510.
- [75] A. Galor, H.-R. Moein, C. Lee, A. Rodriguez, E.R. Felix, K.D. Sarantopoulos, R.C. Levitt, Neuropathic pain and dry eye, *Ocul. Surf.*, 16 (2018) 31-44.
- [76] F. Mantelli, M. Massaro-Giordano, I. Macchi, A. Lambiase, S. Bonini, The cellular mechanisms of dry eye: from pathogenesis to treatment, *J. Cell. Physiol.*, 228 (2013) 2253-2256.
- [77] M. Nye, S. Rudner, L. Bielory, Emerging therapies in allergic conjunctivitis and dry eye syndrome, *Exp. Opin. Pharmacother.*, 14 (2013) 1449-1465.

- [78] <https://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/> (poslednji pristup 28. avgust 2021)
- [79] U. Benelli, Systane lubricant eye drops in the management of ocular dryness, *Clin. Ophthalmol.*, 5 (2011) 783-790.
- [80] L. Tong, A. Petznick, S. Lee, J. Tan, Choice of artificial tear formulation for patients with dry eye: where do we start?, *Cornea*, 31 (2012) S32-S36.
- [81] U.D. Laddha, S.J. Kshirsagar, Formulation of nanoparticles loaded in situ gel for treatment of dry eye disease: In vitro, ex vivo and in vivo evidences, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 61 (2021) 102112.
- [82] D. Elieh Ali Komi, T. Rambasek, L. Bielory, Clinical implications of mast cell involvement in allergic conjunctivitis, *Allergy*, 73 (2018) 528-539.
- [83] R.P. Rietveld, G. ter Riet, P.J. Bindels, J.H. Sloos, H.C. van Weert, Predicting bacterial cause in infectious conjunctivitis: cohort study on informativeness of combinations of signs and symptoms, *BMJ*, 329 (2004) 206-210.
- [84] K. Gumus, D.H. Cavanagh, The role of inflammation and antiinflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca, *Clin. Ophthalmol.*, 3 (2009) 57.
- [85] N.L. Wendel, Antihistamines and Related Antiallergic and Antiulcer Agents, in: T.L. Lemke, D.A. Williams (Eds.) *Foye's principles of medicinal chemistry*, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [86] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=browseByLetter.page&productLetter> (poslednji pristup 30. septembar 2021)
- [87] F.A. Maulvi, D.H. Lakdawala, A.A. Shaikh, A.R. Desai, H.H. Choksi, R.J. Vaidya, K.M. Ranch, A.R. Koli, B.A. Vyas, D.O. Shah, In vitro and in vivo evaluation of novel implantation technology in hydrogel contact lenses for controlled drug delivery, *J. Control. Release*, 226 (2016) 47-56.
- [88] K.M. Ranch, F.A. Maulvi, M.J. Naik, A.R. Koli, R.K. Parikh, D.O. Shah, Optimization of a novel in situ gel for sustained ocular drug delivery using Box-Behnken design: In vitro, ex vivo, in vivo and human studies, *Int. J. Pharm.*, 554 (2019) 264-275.
- [89] A. Brayfield, *Martindale: the complete drug reference*, Pharmaceutical Press, 2017.
- [90] <http://www.chemaxon.com> (poslednji pristup 11. septembar 2021)
- [91] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00768> (poslednji pristup 30. septembar 2021)
- [92] L. Zhu, J. Ao, P. Li, A novel in situ gel base of deacetylase gellan gum for sustained ophthalmic drug delivery of ketotifen: in vitro and in vivo evaluation, *Drug Des. Devel. Ther.*, 9 (2015) 3943-3949.
- [93] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38), MD: United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2020.
- [94] A.M. Avunduk, Y. Tekelioglu, A. Turk, N. Akyol, Comparison of the effects of ketotifen fumarate 0.025% and olopatadine HCl 0.1% ophthalmic solutions in seasonal allergic conjunctivitis: a 30-day, randomized, double-masked, artificial tear substitute-controlled trial, *Clin. Ther.*, 27 (2005) 1392-1402.
- [95] J.I. McGill, A review of the use of olopatadine in allergic conjunctivitis, *Int. Ophthalmol.*, 25 (2004) 171-179.
- [96] F.-y. MA, R.-f. HU, Y.-j. XU, X. HU, Preparation of olopatadine in situ thermosensitive gel for ophthalmic use, *Chin. J. Hosp. Pharm.*, 11 (2012).

- [97] P. Baranowski, B. Karolewicz, M. Gajda, J. Pluta, Ophthalmic drug dosage forms: characterisation and research methods, *Sci. World J.*, 2014 (2014).
- [98] C.-M. Lehr, J. Haas, Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems, *Exp. Opin. Biol. Ther.*, 2 (2002) 287-298.
- [99] A. Garg, P. Upadhyay, Mucoadhesive microspheres: a short review, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 5 (2012) 24-27.
- [100] J. Bassi da Silva, S.B.d.S. Ferreira, O. de Freitas, M.L. Bruschi, A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 43 (2017) 1053-1070.
- [101] G. Ponchel, F. Touchard, D. Duchêne, N.A. Peppas, Bioadhesive analysis of controlled-release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly (acrylic acid)-containing systems, *J. Control. Release*, 5 (1987) 129-141.
- [102] J. Smart, I. Kellaway, H. Worthington, An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36 (1984) 295-299.
- [103] H. Chandasana, Y.D. Prasad, Y.S. Chhonker, T.K. Chaitanya, N.N. Mishra, K. Mitra, P.K. Shukla, R.S. Bhatta, Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK/PD indices: an approach to reduce dose and dosing frequency, *Int. J. Pharm.*, 477 (2014) 317-325.
- [104] Y.S. Chhonker, Y.D. Prasad, H. Chandasana, A. Vishvkarma, K. Mitra, P.K. Shukla, R.S. Bhatta, Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application, *Int. J. Biol. Macromol.*, 72 (2015) 1451-1458.
- [105] E.E. Hassan, J.M. Gallo, A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength, *Pharm. Res.*, 7 (1990) 491-495.
- [106] E.J. German, M.A. Hurst, D. Wood, Reliability of drop size from multi-dose eye drop bottles: is it cause for concern?, *Eye*, 13 (1999) 93-100.
- [107] G. Dargó, A. Vincze, J. Müller, H.J. Kiss, Z.Z. Nagy, G.T. Balogh, Corneal-PAMPA: A novel, non-cell-based assay for prediction of corneal drug permeability, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 128 (2019) 232-239.
- [108] I. Pepić, J. Lovrić, B. Cetina-Čižmek, S. Reichl, J. Filipović-Grčić, Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models, *Drug Discov. Today*, 19 (2014) 31-44.
- [109] M. Hahne, S. Reichl, Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: the influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics, *Int. J. Pharm.*, 416 (2011) 268-279.
- [110] M. Hahne, M. Zorn-Kruppa, G. Guzman, J.M. Brandner, E. Haltner-Ukomado, H. Wätzig, S. Reichl, Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies, *J. Pharm. Sci.*, 101 (2012) 2976-2988.
- [111] M. Juretić, B.J. Dukovski, I. Krtalić, S. Reichl, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, J. Lovrić, I. Pepić, HCE-T cell-based permeability model: a well-maintained or a highly variable barrier phenotype?, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 104 (2017) 23-30.
- [112] A. Luaces-Rodríguez, V. Díaz-Tomé, M. González-Barcia, J. Silva-Rodríguez, M. Herranz, M. Gil-Martínez, M.T. Rodríguez-Ares, C. García-Mazás, J. Blanco-Mendez, M.J. Lamas, Cysteamine polysaccharide hydrogels: study of extended ocular delivery and biopermanence time by PET imaging, *Int. J. Pharm.*, 528 (2017) 714-722.
- [113] P. Agarwal, I.D. Rupenthal, In vitro and ex vivo corneal penetration and absorption models, *Drug Deliv. Transl. Res.*, 6 (2016) 634-647.

- [114] E. Toropainen, V.-P. Ranta, A. Talvitie, P. Suhonen, A. Urtti, Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42 (2001) 2942-2948.
- [115] S. Reichl, C.C. Müller-Goymann, The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride, *Int. J. Pharm.*, 250 (2003) 191-201.
- [116] K.-S. Vellonen, M. Malinen, E. Mannermaa, A. Subrizi, E. Toropainen, Y.-R. Lou, H. Kidron, M. Yliperttula, A. Urtti, A critical assessment of in vitro tissue models for ADME and drug delivery, *J. Control. Release*, 190 (2014) 94-114.
- [117] U. Becker, C. Ehrhardt, M. Schneider, L. Muys, D. Gross, K. Eschmann, U.F. Schaefer, C.-M. Lehr, A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability, *Altern. Lab. Anim.*, 36 (2008) 33-44.
- [118] E. Toropainen, V.-P. Ranta, K.-S. Vellonen, J. Palmgrén, A. Talvitie, M. Laavola, P. Suhonen, K.M. Hämäläinen, S. Auriola, A. Urtti, Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20 (2003) 99-106.
- [119] A. Vincze, G. Dargó, A. Rácz, G.T. Balogh, A corneal-PAMPA-based in silico model for predicting corneal permeability, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2021) 114218.
- [120] J. Barar, A.R. Javadzadeh, Y. Omid, Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers, *Exp. Opin. Drug Deliv.*, 5 (2008) 567-581.
- [121] G. Sunkara, U. Kompella, *Ophthalmic drug delivery systems*, Marcel Dekker Inc New York:, 2003.
- [122] S.L. Wilson, M. Ahearne, A. Hopkinson, An overview of current techniques for ocular toxicity testing, *Toxicology*, 327 (2015) 32-46.
- [123] J.H. Draize, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 82 (1944) 377-390.
- [124] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063> (poslednji pristup 13. septembar 2021)
- [125] A. Pauly, M. Meloni, F. Brignole-Baudouin, J.M. Warnet, C. Baudouin, Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50 (2009) 1644-1652.
- [126] K. Minami, C. Kamei, A chronic model for evaluating the itching associated with allergic conjunctivitis in rats, *Int. Immunopharmacol.*, 4 (2004) 101-108.
- [127] U.A. Shinde, J.N. Shete, H.A. Nair, K.H. Singh, Design and characterization of chitosan-alginate microspheres for ocular delivery of azelastine, *Pharm. Dev. Technol.*, 19 (2014) 813-823.
- [128] M. Takada, T. Yamada, H. Nakahara, Y. Sugimoto, K. Izushi, C. Kamei, Experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs induced by Japanese cedar pollen, *Biol. Pharm. Bull.*, 23 (2000) 566-569.
- [129] C.-C. Huang, W. Yang, C. Guo, H. Jiang, F. Li, M. Xiao, S. Davidson, G. Yu, B. Duan, T. Huang, Anatomical and functional dichotomy of ocular itch and pain, *Nat. Med.*, 24 (2018) 1268-1276.
- [130] Y. Fukushima, T. Nabe, N. Mizutani, K. Nakata, S. Kohno, Multiple cedar pollen challenge diminishes involvement of histamine in allergic conjunctivitis of Guinea pigs, *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (2003) 1696-1700.
- [131] Y. Nakazawa, M. Oka, M. Takehana, Model for studying anti-allergic drugs for allergic conjunctivitis in animals, *Open Med.*, 12 (2017) 231-238.

- [132] F. Liu, L. Xu, N. Chen, M. Zhou, C. Li, Q. Yang, Y. Xie, Y. Huang, C. Ma, Neuronal Fc-epsilon receptor I contributes to antigen-evoked pruritus in a murine model of ocular allergy, *Brain Behav. Immun.*, 61 (2017) 165-175.
- [133] T. Tamura, T. Amano, K. Ohmori, H. Manabe, The effects of olopatadine hydrochloride on the number of scratching induced by repeated application of oxazolone in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 524 (2005) 149-154.
- [134] D. Groneberg, L. Bielory, A. Fischer, S. Bonini, U. Wahn, Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis, *Allergy*, 58 (2003) 1101-1113.
- [135] <https://systane.myalcon.com/eye-care/systane/products/> (poslednji pristup 29. avgust 2021)
- [136] <http://www.alkaloid.rs/proculin-tears.nspx> (poslednji pristup 29. avgust 2021)
- [137] Magistralne formule, Farmaceutsko Društvo Srbije, Beograd, 2008.
- [138] <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/2012/06/p-izrada-galenski-10-2012.pdf> (poslednji pristup 17. septembar 2021)
- [139] <https://www.bioline.scientific.com/blog/3-ways-to-measure-surface-tension> (poslednji pristup 17. septembar 2021)
- [140] H. Takeuchi, J. Thongborisute, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (2005) 1583-1594.
- [141] S. Rossi, M. Bonferoni, F. D'Autilia, G. Sandri, F. Ferrari, C. Caramella, E. Mortara, V. Giannini, F. Gasparri, Associations of natural polymers to modulate mucoadhesion of vaginal rinse-off and leave-on formulations, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 24 (2014) 435-560.
- [142] H. Abdelkader, M.R. Longman, R.G. Alany, B. Pierscionek, Phytosome-hyaluronic acid systems for ocular delivery of L-carnosine, *Int. J. Nanomed.*, 11 (2016) 2815.
- [143] Y. Takai, J. Miyoshi, W. Ikeda, H. Ogita, Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9 (2008) 603-615.
- [144] K. Kinnunen, A. Kauppinen, N. Piippo, A. Koistinen, E. Toropainen, K. Kaarniranta, Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures, *Exp. Eye Res.*, 120 (2014) 82-89.
- [145] B. Jurišić Dukoviski, A. Bračko, M. Šare, I. Pepić, J. Lovrić, In vitro evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery, *Acta Pharm.*, 69 (2019) 621-634.
- [146] A. Pauly, M. Meloni, F. Brignole-Baudouin, J.-M. Warnet, C. Baudouin, Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 50 (2009) 1644-1652.
- [147] C.-C. Huang, Y.S. Kim, W.P. Olson, F. Li, C. Guo, W. Luo, A.J. Huang, Q. Liu, A histamine-independent itch pathway is required for allergic ocular itch, *J. Allergy Clin. Immun.*, 137 (2016) 1267-1270.
- [148] F. Ghasemi Tahrir, F. Ganji, A.R. Mani, E. Khodaverdi, In vitro and in vivo evaluation of thermosensitive chitosan hydrogel for sustained release of insulin, *Drug Deliv.*, 23 (2016) 1038-1046.
- [149] M.E. Johnson, P.J. Murphy, Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome, *Prog. Retin. Eye Res.*, 23 (2004) 449-474.
- [150] R.L. Cleland, J.L. Wang, Ionic polysaccharides. III. Dilute solution properties of hyaluronic acid fractions, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 9 (1970) 799-810.
- [151] G. Paradossi, D.A. Brant, Light scattering study of a series of xanthan fractions in aqueous solution, *Macromolecules*, 15 (1982) 874-879.

- [152] A.T. Florence, J. Siepmann, *Modern Pharmaceutics Volume 2: Applications and Advances*, CRC Press, 2009.
- [153] B.C. Aldrich DS, Brown W *Ophthalmic preparations*. USP Council of experts, 2013.
- [154] N.R. Pires, P.L. Cunha, J.S. Maciel, A.L. Angelim, V.M. Melo, R.C. de Paula, J.P. Feitosa, Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity, *Carbohydr. Polym.*, 91 (2013) 92-99.
- [155] L. Allen, H.C. Ansel, *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*, 10th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013.
- [156] G. Wei, H. Xu, P.T. Ding, S.M. Li, J.M. Zheng, Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies, *J. Control. Release*, 83 (2002) 65-74.
- [157] C. Jarry, C. Chaput, A. Chenite, M.A. Renaud, M. Buschmann, J.C. Leroux, Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 58 (2001) 127-135.
- [158] L.Y. Lim, E. Khor, C.E. Ling, Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 48 (1999) 111-116.
- [159] A. Bindal, G. Narsimhan, S.L. Hem, A. Kulshreshtha, Effect of steam sterilization on the rheology of polymer solutions, *Pharm. Dev. Technol.*, 8 (2003) 219-228.
- [160] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance-exciipient-primary-container_en.pdf (poslednji pristup 15. septembar 2021)
- [161] T. Velpandian, U.S. Das, *Extemporaneously Used Drug Formulations for Ocular Emergencies*, *Pharmacology of Ocular Therapeutics*, Springer, 2016, 385-418.
- [162] M.S. Norn, A. Opauszki, Effects of ophthalmic vehicles on the stability of the precorneal film, *Acta Ophthalmol.*, 55 (1977) 23-34.
- [163] R. Moreira, F. Chenlo, C. Silva, M. Torres, D. Díaz-Varela, L. Hilliou, H. Argence, Surface tension and refractive index of guar and tragacanth gums aqueous dispersions at different polymer concentrations, polymer ratios and temperatures, *Food Hydrocoll.*, 28 (2012) 284-290.
- [164] W. Ribeiro, J.L. Mata, B. Saramago, Effect of concentration and temperature on surface tension of sodium hyaluronate saline solutions, *Langmuir*, 23 (2007) 7014-7017.
- [165] M.Z. Elsabee, R.E. Morsi, A. Al-Sabagh, Surface active properties of chitosan and its derivatives, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 74 (2009) 1-16.
- [166] I. Pepić, J. Filipović-Grčić, I. Jalšenjak, Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 327 (2008) 95-102.
- [167] B. Nagyova, J. Tiffany, Components responsible for the surface tension of human tears, *Curr. Eye Res.*, 19 (1999) 4-11.
- [168] M.A. Kalam, Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone, *Int. J. Biol. Macromol.*, 89 (2016) 127-136.
- [169] B. McKenzie, G. Kay, K.H. Matthews, R. Knott, D. Cairns, Preformulation of cysteamine gels for treatment of the ophthalmic complications in cystinosis, *Int. J. Pharm.*, 515 (2016) 575-582.
- [170] A. Ahuja, R.K. Khar, J. Ali, Mucoadhesive drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 23 (1997) 489-515.
- [171] R. Shaikh, T.R.R. Singh, M.J. Garland, A.D. Woolfson, R.F. Donnelly, Mucoadhesive drug delivery systems, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 3 (2011) 89.

- [172] C.-A. Lee, B.-S. Kim, C.-W. Cho, Quantitative evaluation of mucoadhesive polymers to compare the mucoadhesion, *J. Pharm. Investigat.*, 46 (2016) 189-194.
- [173] A. Graça, L.M. Gonçalves, S. Raposo, H.M. Ribeiro, J. Marto, Useful in vitro techniques to evaluate the mucoadhesive properties of hyaluronic acid-based ocular delivery systems, *Pharmaceutics*, 10 (2018) 110.
- [174] A. Račić, B. Čalijska, J. Milić, N. Milašinović, D. Krajišnik, Development of polysaccharide-based mucoadhesive ophthalmic lubricating vehicles: the effect of different polymers on physicochemical properties and functionality, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 49 (2019) 50-57.
- [175] S. Rossi, B. Vigani, M.C. Bonferoni, G. Sandri, C. Caramella, F. Ferrari, Rheological analysis and mucoadhesion: A 30 year-old and still active combination, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 156 (2018) 232-238.
- [176] N. Patel, V. Thakkar, V. Metalia, L. Baldaniya, T. Gandhi, M. Gohel, Formulation and development of ophthalmic in situ gel for the treatment ocular inflammation and infection using application of quality by design concept, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 42 (2016) 1406-1423.
- [177] J. Ceulemans, A. Ludwig, Optimisation of carbomer viscous eye drops: an in vitro experimental design approach using rheological techniques, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 54 (2002) 41-50.
- [178] T. Mezger, *The Rheology Handbook*. 4th ed., Vincentz Network, 2014.
- [179] A. Fahr, *Ophthalmic preparations Voigt's pharmaceutical technology*, Voigt's pharmaceutical technology, John Wiley & Sons, 2018.
- [180] H. Fadda, A. Kahalili, P. Khaw, S. Brocchini, Ocular drug delivery. In: Aulton ME, Taylor KMG, editors. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, 4th ed., Elsevier, 2013.
- [181] P. Aragona, P.A. Simmons, H. Wang, T. Wang, Physicochemical Properties of Hyaluronic Acid-Based Lubricant Eye Drops, *Transl. Vis. Sci. Technol.*, 8 (2019) 2-2.
- [182] Y. Liu, J. Liu, X. Zhang, R. Zhang, Y. Huang, C. Wu, In situ gelling gelrite/alginate formulations as vehicles for ophthalmic drug delivery, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 11 (2010) 610-620.
- [183] M. Łaszcz, K. Trzecińska, A. Witkowska, A. Ciesielska, K. Badowska-Rosłonek, K. Kuziak, Structural and physicochemical studies of olopatadine hydrochloride conformational polymorphs, *J. Pharm. Sci.*, 105 (2016) 2419-2426.
- [184] S. Soltani, P. Zakeri-Milani, M. Barzegar-Jalali, M. Jelvehgari, Design of eudragit RL nanoparticles by nanoemulsion method as carriers for ophthalmic drug delivery of ketotifen fumarate, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 19 (2016) 550.
- [185] W.K. Delan, M. Zakaria, B. Elsaadany, A.N. ElMeshad, W. Mamdouh, A.R. Fares, Formulation of simvastatin chitosan nanoparticles for controlled delivery in bone regeneration: optimization using Box-Behnken design, stability and in vivo study, *Int. J. Pharm.*, (2020) 119038.
- [186] B. Nayak, R. Singh, Synthesis and characterization of grafted hydroxypropyl guar gum by ceric ion induced initiation, *Eur. Polym. J.*, 37 (2001) 1655-1666.
- [187] K. Benešová, M. Pekař, L. Lapčík, J. Kučerík, Stability evaluation of n-alkyl hyaluronic acid derivatives by DSC and TG measurement, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 83 (2006) 341-348.
- [188] A. Ćirić, Đ. Medarević, B. Čalijska, V. Dobričić, M. Mitrić, L. Djekic, Study of chitosan/xanthan gum polyelectrolyte complexes formation, solid state and influence on ibuprofen release kinetics, *Int. J. Biol. Macromol.*, 148 (2020) 942-955.
- [189] C. Lu, L. Kostanski, H. Ketelson, D. Meadows, R. Pelton, Hydroxypropyl Guar– Borate Interactions with Tear Film Mucin and Lysozyme, *Langmuir*, 21 (2005) 10032-10037.

- [190] M.A. Rosasco, S.L. Bonafede, S.N. Faudone, A.I. Segall, Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 134 (2018) 1929-1941.
- [191] K. Cho, T. Chung, B. Kim, M. Kim, J. Lee, W. Wee, C. Cho, Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro, *Int. J. Pharm.*, 260 (2003) 83-91.
- [192] Z.M. Fathalla, A. Vangala, M. Longman, K.A. Khaled, A.K. Hussein, O.H. El-Garhy, R.G. Alany, Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine in situ gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 114 (2017) 119-134.
- [193] N.Ü. Okur, V. Yozgatlı, M.E. Okur, A. Yoltaş, P.I. Sifaka, Improving therapeutic efficacy of voriconazole against fungal keratitis: Thermo-sensitive in situ gels as ophthalmic drug carriers, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 49 (2019) 323-333.
- [194] H. Brockman, G. Graff, J. Spellman, J. Yanni, A comparison of the effects of olopatadine and ketotifen on model membranes, *Acta Ophthalmol. Scand.*, 78 (2000) 10-15.
- [195] K. Han, O.E. Woghiren, R. Priefer, Surface tension examination of various liquid oral, nasal, and ophthalmic dosage forms, *Chem. Cent. J.*, 10 (2016) 1-5.
- [196] D. Bonn, J. Eggers, J. Indekeu, J. Meunier, E. Rolley, Wetting and spreading, *Rev. Mod. Phys.*, 81 (2009) 739.
- [197] H. Abdelkader, R. G Alany, Controlled and continuous release ocular drug delivery systems: pros and cons, *Curr. Drug Deliv.*, 9 (2012) 421-430.
- [198] A. Račić, B. Čalija, J. Milić, B.J. Dukovski, J. Lovrić, V. Dobričić, A. Micov, M. Vuković, R. Stepanović-Petrović, D. Krajišnik, Formulation of olopatadine hydrochloride viscous eye drops—physicochemical, biopharmaceutical and efficacy assessment using in vitro and in vivo approaches, *Eur. J. Pharm. Sci.*, (2021) 105906.
- [199] B.J. Dukovski, M. Juretić, D. Bračko, D. Randjelović, S. Savić, M.C. Moral, Y. Diebold, J. Filipović-Grčić, I. Pepić, J. Lovrić, Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment, *Int. J. Pharm.*, 576 (2020) 118979.
- [200] D. Saaber, S. Wollenhaupt, K. Baumann, S. Reichl, Recent progress in tight junction modulation for improving bioavailability, *Exp. Opin. Drug Discov.*, 9 (2014) 367-381.
- [201] M. Juretic, B. Jurisic Dukovski, I. Krtalic, S. Reichl, B. Cetina-Cizmek, J. Filipovic-Grcic, J. Lovric, I. Pepic, HCE-T cell-based permeability model: A well-maintained or a highly variable barrier phenotype?, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 104 (2017) 23-30.
- [202] S. Tucker, L. Melsen, R. Compans, Migration of polarized epithelial cells through permeable membrane substrates of defined pore size, *Eur. J. Cell Biol.*, 58 (1992) 280-290.
- [203] S. Majumdar, K. Hippalgaonkar, M.A. Repka, Effect of chitosan, benzalkonium chloride and ethylenediaminetetraacetic acid on permeation of acyclovir across isolated rabbit cornea, *Int. J. Pharm.*, 348 (2008) 175-178.
- [204] S. Pescina, P. Govoni, A. Potenza, C. Padula, P. Santi, S. Nicoli, Development of a convenient ex vivo model for the study of the transcorneal permeation of drugs: histological and permeability evaluation, *J. Pharm. Sci.*, 104 (2015) 63-71.
- [205] A. Ono, K. Sugano, Application of the BCS biowaiver approach to assessing bioequivalence of orally disintegrating tablets with immediate release formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 64 (2014) 37-43.
- [206] C. Wu, P. Clift, C.H. Fry, J.A. Henry, Membrane action of chloramphenicol measured by protozoan motility inhibition, *Arch. Toxicol.*, 70 (1996) 850-853.

- [207] B. Mahaling, D.S. Katti, Understanding the influence of surface properties of nanoparticles and penetration enhancers for improving bioavailability in eye tissues in vivo, *Int. J. Pharm.*, 501 (2016) 1-9.
- [208] P. Bełdowski, P. Weber, A. Dédinaite, P.M. Claesson, A. Gadomski, Physical crosslinking of hyaluronic acid in the presence of phospholipids in an aqueous nano-environment, *Soft Matter*, 14 (2018) 8997-9004.
- [209] D.F. Wieland, P. Degen, T. Zander, S. Gayer, A. Raj, J. An, A. Dédinaite, P. Claesson, R. Willumeit-Römer, Structure of DPPC–hyaluronan interfacial layers—effects of molecular weight and ion composition, *Soft Matter*, 12 (2016) 729-740.
- [210] M. Herzog, L. Li, H.-J. Galla, R. Winter, Effect of hyaluronic acid on phospholipid model membranes, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 173 (2019) 327-334.
- [211] R. de Oliveira Pedro, A.R. Pereira, O.N. Oliveira, P.B. Miranda, Interaction of chitosan derivatives with cell membrane models in a biologically relevant medium, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 192 (2020) 111048.
- [212] E.L. Kiss, S. Berkó, A. Gácsi, A. Kovács, G. Katona, J. Soós, E. Csányi, I. Gróf, A. Harazin, M.A. Deli, Development and Characterization of Potential Ocular Mucoadhesive Nano Lipid Carriers Using Full Factorial Design, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 682.
- [213] S. Jouenne, Polymer flooding in high temperature, high salinity conditions: Selection of polymer type and polymer chemistry, thermal stability, *J. Pet. Sci. Eng.*, 195 (2020) 107545.
- [214] <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en> (poslednji pristup 30. septembar 2021)
- [215] O. Felt, P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, R. Gurny, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention, *Int. J. Pharm.*, 180 (1999) 185-193.
- [216] C. Debbasch, S.B. De La Salle, F. Brignole, P. Rat, J.-M. Warnet, C. Baudouin, Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43 (2002) 3409-3415.
- [217] F.A. Maulvi, T.G. Soni, D.O. Shah, Extended release of hyaluronic acid from hydrogel contact lenses for dry eye syndrome, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 26 (2015) 1035-1050.
- [218] I. Krtalić, S. Radošević, A. Hafner, M. Grassi, M. Nenadić, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, I. Pepić, J. Lovrić, D-optimal design in the development of rheologically improved in situ forming ophthalmic gel, *J. Pharm. Sci.*, 107 (2018) 1562-1571.
- [219] L. Sebbag, R. Allbaugh, A. Weaver, Y.-J. Seo, J.P. Mochel, Histamine-induced conjunctivitis and breakdown of blood-tear barrier in dogs: a model for ocular pharmacology and therapeutics, *Front. Pharmacol.*, 10 (2019) 752.
- [220] S.M. Athari, E.M. Nasab, S.S. Athari, Animal model of allergy and asthma; protocol for researches, *Res. Sq.*, (2019).
- [221] M. Schmelz, R. Schmidt, C. Weidner, M. Hilliges, H. Torebjork, H.O. Handwerker, Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens, *J. Neurophysiol.*, 89 (2003) 2441-2448.

7.PRILOZI

7.1 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

Račić A, Čalija B, Milić J, Jurišić Dukovski B, Lovrić J, Dobričić V, Micov A, Vuković M, Stepanović-Petrović R, Krajišnik D. Formulation of olopatadine hydrochloride viscous eye drops – physicochemical, biopharmaceutical and efficacy assessment using *in vitro* and *in vivo* approaches, *Eur J Pharm Sci*, 166 (2021) 105906.

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

Račić A, Čalija B, Milić J, Milašinović N, Krajišnik D. Development of polysaccharide-based mucoadhesive ophthalmic lubricating vehicles: The effect of different polymers on physicochemical properties and functionality, *J Drug Deliv Sci Technol*, 49 (2019) 50-57.

Radovi objavljeni u istaknutim nacionalnim časopisima (M52):

Čalija B, Milić J, Krajišnik D, **Račić A**. Karakteristike i primena hitozana u farmaceutskim/biofarmaceutskim preparatima, *Arh farm*, 63 (2013) 347-364.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

Račić A, Krajišnik D, Jančić-Stojanović B, Čalija B, Milić J. Određivanje rastvorljivosti olopatadin-hidroklorida primjenom tečne hromatografije hidrofiličnih interakcija i UV spektrofotometrijske metode, II Kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, 28-31.5.2015. Budva, Zbornik sažetaka radova, 169-170.

Račić A, Krajišnik D, Jančić-Stojanović B, Čalija B, Milić J. Evaluation of chitosan and hydroxypropyl guar gum as viscosity modifiers in olopatadine hydrochloride ophthalmic solutions, 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 22-24.9.2016. Belgrade, Serbia, Book of Proceedings. *Arh farm*, 66 (2016) 189-190.

Račić A, Krajišnik D, Čalija B, Milić J. Characterization of viscous ophthalmic vehicles containing chitosan and hydroxypropyl guar gum – a comparative study, 4th Congress on Innovation in Drug Delivery, 25-28.9.2016. Antibes-Juan-Les-Pins, France, Book of Abstracts, 47.

Račić A, Krajišnik D, Čalija B, Nikolić I, Milić J. The effect of dilution and temperature on the viscosity of various ocular lubricants. 7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 5-7.10.2017. Balatonfüred, Hungary, *Acta Pharm Hung*, 87 (2017) 197.

Račić A, Krajišnik D, Čalija B, Milić J. Formulation and development ophthalmic mucoadhesive polymer solutions, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19-22.3.2018. Granada, Spain, USB stick, P161

Račić A, Krajišnik D, Čalija B, Savić S, Milić J. Evaluation of mucoadhesive properties of ocular lubricants containing hydroxypropyl guar gum and chitosan, 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 20-22.9.2018. Szeged, Hungary, *Acta Pharm Hung*, 88 (2018) 140-141.

Račić A, Čalija B, Milić J, Dobričić V, Krajišnik D. Formulation and functionality assessment of ketotifen fumarate ophthalmic solutions containing polysaccharide-based viscosity modifiers, Treći kongres farmaceuta Crne Gore sa međunarodnim učešćem, Bečići, 9-12.5.2019, Zbornik sažetaka radova, 192.

Račić A, Čalija B, Milić J, Krajišnik D. Formulation and functionality assesment of ocular lubricants containing sodium hyaluronate and hydroxypropyl guar gum, Treći kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Sarajevo 10-13.10.2019, Knjiga sažetaka, 250-251.

Račić A, Jurišić Dukovski B, Lovrić J, Dobričić V, Čalija B, Milić J, Krajišnik D. Permeability and biocompatibility evaluation of olopatadine hydrochloride viscous ophthalmic solutions using in vitro 3D corneal model, 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Virtual Meeting, 14-18.5.2021. Abstract Overview.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

Račić A, Krajišnik D, Čalija B, Milić J. Polymer–mucin interaction in polysaccharide-based ocular lubricants: a rheological point of view, VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, 10-14.10.2018. Beograd, Arh farm, 68 (2018) 636-637.

8. BIOGRAFIJA

8.1 BIOGRAFIJA AUTORA

Anđelka Račić je rođena 23.01.1986. u Banjoj Luci. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Banjoj Luci, a studije farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci koje je upisala 2005. godine. Tokom studiranja više puta je nagrađivana od strane Medicinskog fakulteta za postignute rezultate u toku studija. Dobitnik je „Zlatne plakete“ Univerziteta u Banjoj Luci kao najbolji student generacije 2005/2010. Bila je stipendista grada Banja Luka, Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske i dobitnik prestižne stipendije „Fond dr Milan Jelić“ koja se dodeljuje izvanrednim studentima. Diplomirala je 2010. godine sa prosječnom ocjenom 9,56.

Od 2012. godine zaposlena je u zvanju asistenta, a trenutno u zvanju višeg asistenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Medicinskog fakulteta u Banjoj Luci gdje učestvuje u izvođenju praktične nastave i u naučno-istraživačkom radu sa studentima. Doktorske akademske studije – modul farmaceutska tehnologija na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu upisala je šk. 2013/2014. godine.

Govori engleski jezik.

Udata i majka dvoje dece.

9. IZJAVE

9.1 IZJAVA O AUTORSTVU

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Анђелка Рачић

Број индекса 39/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Полисахаридни мукоадхезивни вехикулуми као носачи за лековите супстанце из групе антихистаминика за офталмолошку примену“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и

да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 01.10.2021.

Потпис аутора



9.2 IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Анђелка Рачић
Број индекса 39/13
Студијски програм Фармацеутска технологија
Наслов рада „Полисахаридни мукоадхезивни вехикулуми као носачи за лековите супстанце из групе антихистаминика за офталмолошку примену“
Ментор проф. др Данина Крајишник


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 01.10.2021.

Потпис аутора



9.3 IZJAVA O KORIŠĆENJU

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Полисахаридни мукоадхезивни вехикулуми као носачи за лековите супстанце из групе антихистаминика за офталмолошку примену“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

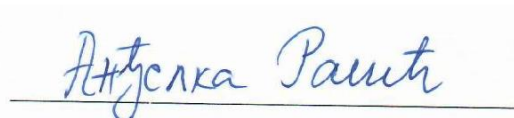
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном притупу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 01.10.2021.

Потпис аутора



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.