

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU UNIVERZITETA U BEOGRADU –
FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 9.9.2021. godine, imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Anđelke Račić, diplomiranog farmaceuta, pod naslovom:

„Polisaharidni mukoadhezivni vehikulumi kao nosači za lekovite supstance iz grupe antihistaminika za oftalmološku primenu“.

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Snežana Savić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, predsednik
2. Dr sc. Bojan Čalija, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Sonja Vučen, docent, Univerzitet u Korku, Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. Dr sc. Ana Micov, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći izveštaj:

I Z V E Š T A J

1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom: „Polisaharidni mukoadhezivni vehikulumi kao nosači za lekovite supstance iz grupe antihistaminika za oftalmološku primenu“, sadrži šest poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura. Na početku doktorske disertacije je priložen sažetak/abstract, a na kraju se nalazi spisak publikovanih i saopštenih radova koji čine deo doktorske disertacije, kratka biografija kandidata i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije.

Disertacija je napisana na 148 strana i sadrži: 43 slike (11 u uvodu, 7 u eksperimentalnom delu, 25 u rezultatima i diskusiji), 25 tabela (3 u uvodu, 5 u eksperimentalnom delu, 17 u rezultatima i diskusiji) i 221 literaturni navod.

U *Uvodu* je, kroz 5 potpoglavlja dat pregled naučnih saznanja značajnih za predmet proučavanja doktorske disertacije: *Teorijski aspekti oftalmološke primene lekova; Metode za prevazilaženje problema niske okularne raspoloživosti; Sindrom suvog oka i alergijski konjunktivitis; Model lekovite supstance; Metode karakterizacije oftalmoloških preparata.*

U prvom potpoglavlju **Uvoda** su prikazani najznačajniji podaci o građi oka, anatomskim i fiziološkim barijerama oka pri čemu je poseban naglasak stavljen na građu i funkciju struktura prednjeg segmenta oka: konjunktivu i rožnjaču. U nastavku su ukratko opisani procesi lučenja i drenaže suza, potom građa i svojstva suznog filma, značajna za okularnu raspoloživost lekovitih supstanci primenjenih lokalno na oko. Na kraju ovog potpoglavlja navedeni su podaci o farmakokinetici lokalno/topikalno primenjenih lekova u terapiji oboljenja prednjeg segmenta oka.

U drugom delu **Uvoda** dat je pregled metoda kojima se može prevazići problem niske okularne raspoloživosti, a odabrani pristupi koji su predmet proučavanja doktorske disertacije su detaljnije prikazani u naredna dva dela Uvoda. U tom smislu, u fokus su stavljeni polimeri kao sredstva za povećanje viskoziteta i pojačivači penetracije kojima je posvećen značajan deo ovog potpoglavlja. Detaljnim pregledom literaturnih navoda dat je opis polimera koji predstavljaju predmet istraživanja doktorske disertacije, a to su derivati celuloze (hidroksietilceluloza (HEC) i hipromeloza/hidroksipropilmetilceluloza (HPMC)), hitozan (niske (LMW CS) i srednje molekulske mase (MMW CS)), hidroksipropil guar guma (HP GG) i natrijum-hijaluronat (NH), sa posebnim osvrtom na njihovu primenu u sastavu oftalmoloških preparata. Predstavljeni su, do sada opisani i potvrđeni u literaturi, kao i razmatrani potencijalni sinergistički efekti različitih kombinacija polimera koji omogućavaju postizanje više pozitivnih efekata, kao što su značajniji doprinos viskozitetu i lubrikaciji, uz smanjenje koncentracije pojedinačnih polimera. Takođe, razmatrane su karakteristike oftalmoloških preparata kao što su mukoadhezivnost, viskozitet i reološko ponašanje, a koje su značajne kako za okularnu raspoloživost i terapijski efekat, tako i za dobru podnošljivost i komplikjansu.

U trećem potpoglavlju **Uvoda** su izloženi najznačajniji podaci o sindromu suvog oka i alergijskog konjunktivitisa, kao učestalijih patoloških stanja oka koji klinički imaju slične simptome i podsećaju jedan na drugi. Dat je osvrt na trenutne smernice za lečenje sindroma suvog oka i alergijskog konjunktivitisa i istaknut najveći nedostatak konvencionalnih oftalmoloških preparata koji se primenjuju u ove svrhe, a to je kratko vreme zadržavanja na mestu primene i kratkotrajan efekat u otklanjanju simptoma.

U četvrtom potpoglavlju uvodnog dela doktorske disertacije je dat detaljan prikaz fizičko-hemijskih osobina, delovanje i upotreba olopatadina (OLO) i ketotifena (KF) kao model lekovitih supstanci, koje se odlikuju različitom fizičko-hemijskom prirodom i terapijskim koncentracijama. Prepoznat je značaj različitih pristupa u lečenju oboljenja oka (sindrom suvog oka i alergijski konjunktivitis) koji se ogleda kroz razvoj novih formulacija uključujući novije polimere i njihove kombinacije.

U poslednjem delu **Uvoda** dat je ukratko prikaz metoda karakterizacije oftalmoloških preparata počev od farmakopejskih ispitivanja do primene inoviranih *in vitro/in vivo* tehnika biofarmaceutske karakterizacije koje podrazumevaju procenu mukoadhezivnih karakteristika, kornealne permeabilnosti i efikasnosti na *in vivo* modelu alergijskog konjunktivitisa. Istaknuta je primena *in vitro* transkornealnih modela za ispitivanje permeabilnosti zasnovanih na besmrtnoj ćelijskoj liniji humanih epitelnih ćelija rožnjače (engl. *Human Corneal Epithelial Cells*, HCE-T), te na primeni veštačkih paralelnih membrana (engl. *Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay*, PAMPA), kao jednoj od savremenih metoda predviđanja kornealne permeabilnosti lekovitih supstanci iz ispitivanih kapi za oči. Naglašen je značaj poštovanja principa Direktive 2010/63/EU Evropskog Parlamenta prilikom izbora metoda ispitivanja na životinjama, kao i prednost korišćenja *in vitro* uzgojenih kultura humanih ćelija epitela rožnjače i testa redukcije tetrazolijumove soli (MTT) za sprovođenje preliminarnih studija citotoksičnosti novih oftalmoloških formulacija.

Osnovni Cilj rada je definisan na jasan način - 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. Dodatno, cilj disertacije je i primena inoviranih *in vitro/in vivo* tehnika biofarmaceutske karakterizacije, odnosno procena okularne raspoloživosti dva model leka iz grupe antihistaminika, različitih fizičko-hemijskih karakteristika, primenjenih u različitim terapijskim koncentracijama (olopatadin i ketotifen), iz prethodno formulisanih biokompatibilnih vehikuluma. U cilju komparativnih istraživanja doprinosa različitih polimera vremenu zadržavanja i efikasnosti lekovitih supstanci, dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima dobijenim u uporednom ispitivanju i komercijalno dostupnih kapi za oči sa istim lekovitim supstancama, koji u sastavu ne sadrže polimere ili druge supstance za povećanje viskoziteta.

Kandidat je postavljene ciljeve realizovao kroz tri faze istraživačkog rada, čiji opis je dat u eksperimentalnom delu rada.

U poglavlju *Eksperimentalni deo* navedene su karakteristike korišćenih polaznih materijala i prikazan je detaljan opis eksperimentalnih procedura, uređaja i opreme koji su korišćeni kako bi se realizovali postavljeni ciljevi istraživanja.

U prvoj *fazi eksperimentalnog rada* prikazan je detaljan postupak izrade vehikuluma koji sadrže pojedinačne polimere u rasponu koncentracija 0,25–1,5%. Navodi se da odabrane koncentracije zavise od vrste upotrebljenog polimera i postavljene su na osnovu relevantnih literaturnih podataka. Na osnovu procene doprinosa pojedinačnih polimera viskozitetu vehikuluma, odabrane su odgovarajuće koncentracije polimera koji su korišćeni u kombinaciji prilikom izrade vehikuluma. U ovoj fazi izvršeno je merenje molekulske mase za one polimere za koje nisu bili dostupni tačni podaci u literaturi i sertifikatima analize (MMW CS i dva uzorka HP GG), primenom tehnike koja se zasniva na zavisnosti intenziteta rasute svetlosti od koncentracije rastvora. Prikazan je kvalitativni i kvantitativni sastav 14 formulisanih vehikuluma, kao i sastavi registrovanih proizvoda i galenskog leka koji su korišćeni u okviru eksperimentalnog dela rada.

Prikazan je opis metoda detaljne fizičko-hemijske karakterizacije izrađenih vehikuluma koja je podrazumevala ispitivanja izgleda i bistrine, osmolalnosti, tenziometrijsko merenje površinskog napona, viskoziteta, kao i tipa proticanja pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima. Izvršena je selekcija onih vehikuluma koji poseduju preporučene karakteristike za oftalmološke preparate. Izvršeno je ispitivanje preliminarnosti izrađenih vehikuluma nakon čuvanja 28 dana pri ambijentalnim uslovima (uobičajen rok upotrebe za oftalmološke preparate nakon otvaranja), pri čemu su nakon isteka definisanog perioda ispitivani parametri izgleda, bistrine, pH i viskoziteta.

Na kraju je predstavljena metodologija za procenu mukoadhezivnih karakteristika odabranih vehikuluma kako onih sa pojedinačnim, tako i onih sa kombinacijom dva polimera, koja se sastojala u primeni tri različite *in vitro* metode zasnovane na određivanju različitih parametara relevantnih za karakterizaciju ispitivanih vehikuluma (turbidimetrijska, metoda koja se zasniva na promeni zeta potencijala i viskozimetrijska metoda).

U *drugoj fazi eksperimentalnog rada* opisan je postupak izrade 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. Osim toga, na početku druge faze izvršena je evaluacija mogućih interakcija između polimera koji su kombinovani tokom izrade vehikuluma, kao i polimera i model lekovitih supstanci primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) i infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (FTIR spektroskopije).

U okviru ove faze eksperimentalnog rada izvršena je sveobuhvatna fizičko-hemijska karakterizacija kapi za oči sa lekovitim supstancama u cilju procene njihove pogodnosti za oftalmološku primenu. Formulirane kapi za oči su okarakterisane u pogledu izgleda i bistrine, pH vrednosti, osmolalnosti i viskoziteta (reološka merenja), ranije opisanim metodama. Dodatno, predstavljene su metode merenja površinskog napon i kontaktnog ugla kapi za oči sa lekovitim supstancama, metoda kapi koja visi (engl. *pendent drop method*), odnosno metoda položene kapljice (engl. *sessile drop method*), pomoću Theta-Optical Tenziometra (Biolin Scientific, Švedska)

Sledi opis metodologije koja je korišćena za procenu kornealne permeabilnosti lekovitih supstanci iz odabranih formulacija, što je podrazumevalo primenu *in vitro* tehnika: humanih ćelijskih modela rožnjače, počev od detaljnog opisa uslova uzgoja HCE-T ćelija i kultivacije dva *in vitro* ćelijska modela, zatim PAMPA testa. U ispitivanje kornealne permeabilnosti istovremeno su bili uključeni komercijalno dostupni preparati kapi za oči sa istim lekovitim supstancama, kako bi se mogao proceniti uticaj upotrebljenih polimera na permeaciju lekovitih supstanci kroz modele rožnjače.

Na kraju, prikazan je postupak procene fizičko-hemijske stabilnosti formuliranih kapi za oči sa lekovitim supstancama tokom godinu dana čuvanja u frižideru (4 ± 1 °C) i ambijentalnoj temperaturi 22 ± 2 °C, pri čemu su u definisanim vremenskim intervalima praćeni sledeći parametri: izgled, bistrina, pH vrednost, osmolalnost, viskozitet (kod uzoraka čuvanih na 22 ± 2 °C) i sadržaj lekovitih supstanci. Dodatno, sprovedena je studija ubrzanog ispitivanja stabilnosti primenom metode cikličnih promena temperature (tzv. stres studija stabilnosti), kroz 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.

U *trećoj fazi eksperimentalnog rada* prikazan je opis metode koja je korišćena za procenu biokompatibilnosti na dva HCE-T ćelijska modela, nakon sprovedenih studija permeabilnosti. Biokompatibilnost je procenjena na osnovu vijabilnosti ćelija tretiranih ispitivanim formulacijama sprovođenjem MTT testa. U nastavku je predstavljen protokol za *in vivo* procenu efikasnosti model lekovitih supstanci u otklanjanju svraba nakon veštački izazvanog alergijskog konjunktivitisa primenom histamina na oku miševa muškog pola, soja C57BL/6.

Sve metode i procedure korišćene u eksperimentalnom radu ove doktorske disertacije su prikladne i u saglasnosti sa savremenim zahtevima naučnoistraživačkog rada u relevantnoj oblasti, što je omogućilo dobijanje objektivnih i pouzdanih rezultata na osnovu kojih je bilo moguće donošenje adekvatnih naučnih zaključaka.

Ispitivanja na životinjama opisana u izrađenoj doktorskoj disertaciji sprovedena su u skladu sa Direktivom 2010/63/EU Evropskog parlamenta o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne svrhe, a primenjeni protokol je odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Beogradu –Farmaceutskog fakulteta.

Poglavlje **Rezultati i diskusija**, koje prate tri prethodno navedene faze eksperimentalnog rada, je prikazano na 58 stranica teksta, uključujući 25 slika i 17 tabela, a podeljeno je na tri potpoglavlja: *Rezultati i diskusija prve faze eksperimentalnog rada*; *Rezultati i diskusija druge faze eksperimentalnog rada* i *Rezultati i diskusija treće faze eksperimentalnog rada*. Analiza rezultata i diskusija dobijenih rezultata i postavljenih hipoteza je izneta na razumljiv način i uz odgovarajuću komparaciju sa podacima dobijenim u sličnim relevantnim naučnim istraživanjima.

U poglavlju **Zaključci** je dat pregled izvedenih zaključaka iz analize dobijenih rezultata u svakoj fazi eksperimentalnog rada pojedinačno.

U poglavlju **Literatura** naveden je spisak od 221 literaturnog navoda citiranih u okviru doktorske disertacije.

2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u tri celine, shodno postavljenim ciljevima i u skladu sa načinom sprovođenja eksperimentalnog dela istraživanja.

U *prvom delu* su prikazani rezultati sveobuhvatne fizičko-hemijske karakterizacije 14 vehikuluma koji su nakon preliminarnih studija odabrani za dalja ispitivanja. Svi vehikulumi sadržavali su jedan ili kombinaciju dva polisaharidna polimera i to HPMC, HEC, HP GG, LMW CS, MMW CS i NH. Svi izrađeni vehikulumi bili su bistri izuzev uzoraka sa višim koncentracijama HP GG ($\geq 1,0\%$, m/V) kod kojih je uočena blaga opalescencija. Prikazane vrednosti pH (5,5–7,4) i osmolalnosti (250–329 mOsm/kg) bile su u granicama preporučenim za oftalmološke preparate. Reološkom analizom na 20 °C i u simuliranim fiziološkim uslovima uz dodatak veštačke suzne tečnosti na 34 °C, obuhvaćeni su svi ispitivani vehikulumi i četiri komercijalno dostupna preparata, namenjena za tretman sindroma suvog oka, koji sadrže sličan tip polisaharidnih polimera, radi poređenja. Svi ispitivani vehikulumi, ispoljavali su vremenski zavisno (engl. *shear thinning*) proticanje, izuzev vehikuluma koji su sadržavali derivate celuloze, kod kojih se viskozitet nije značajno menjao sa promenom brzine smicanja u rasponu 10–100 s⁻¹. Vrednosti prividnih viskoziteta izrađenih vehikuluma na 20 °C, pri 100 s⁻¹, bile su u rasponu 2,2–578 mPa·s. Najniži viskozitet imao je vehikulum u kojem je kao polimer korišćen LMW CS (0,5%, m/V), dok je najviši viskozitet imao vehikulum koji je u svom sastavu imao najvišu koncentraciju HP GG (1,5%, m/V). Vrednosti prividnih viskoziteta ispitivanih komercijalnih preparata (pri 100 s⁻¹) nalazile su se izvan opsega preporučenih vrednosti viskoziteta navedenog za tačne oftalmološke preparate (5–50 mPa·s), izuzev vehikuluma sa NH (18,9 mPa·s), što može biti uzrok njihove brze eliminacije iz prekornealnog područja. U toku ove faze, uočena je pojava reološkog sinergizma polimera, jer su vehikulumi koji su u svom sastavu imali kombinaciju dva polimera imali značajno viši viskozitet od vehikuluma sa pojedinačnim polimerima u istim koncentracijama. Nakon razblaženja vehikuluma sa suznom tečnošću kod većine vehikuluma je došlo do značajnog smanjenja viskoziteta, kod nekih i do četiri puta, što je bio dodatni razlog za njihovo isključivanje iz daljeg ispitivanja. Nasuprot tome, kod vehikuluma sa HP GG (0,25%, m/V) i NH (0,4%, m/V) sa razblaženjem i zagrevanjem na temperaturu površine oka, došlo je do značajnog povećanja prividnog viskoziteta. Slični rezultati dobijeni su i kod komercijalnih preparata koji u svom sastavu sadrže iste polimere, ali za razliku od formulisanih vehikuluma, bez statističke značajnosti. Nakon sprovedenog procesa sterilizacije parom kod svih ispitivanih vehikuluma došlo je do značajnih promena viskoziteta, dok kod ostalih fizičko-hemijskih parametara nije bilo značajnijih promena. Rezultati merenja površinskog napona konzerviranih vehikuluma koji sadrže pojedinačne polimere (33–36 mN/m), pokazali su nešto niže vrednosti od fizioloških vrednosti površinskog napona suzne tečnosti, što je poželjno kada je u pitanju terapija sindroma suvog oka. Rezultati ispitivanja mukoadhezivnih svojstava odabranih vehikuluma različitim metodama, ukazuju na izražen afinitet MMW CS i NH za interakcije sa mucinom. Porast turbiditeta u smešama vehikuluma koji sadrže MMW CS i mucina ukazuju na pojavu međusobnih interakcija, takođe, promena zeta potencijala čestica mucina od negativnih (-7,8 mV) sve do izrazito pozitivnih vrednosti (+16,5, odnosno +21,0 mV), predstavlja potvrdu međusobne interakcije pozitivno naelektrisanog MMW CS i negativno naelektrisanih čestica mucina. Turbidimetrijska metoda i metoda zasnovana na promenama zeta potencijala imaju izvesna ograničenja i nisu mogle detektovati mukoadhezivna svojstva vehikuluma koji su sadržavali NH, čiji je mukoadhezivni potencijal okarakterisan tek primenom kontinulane reološke analize. Izračunavanjem parametara mukoadhezivnog indeksa i normalizovanog mukoadhezivnog indeksa, potvrđen je afinitet MMW CS prema mucinu, ali i visok stepen interakcije NH, kao već poznatog

mukoadhezivnog polimera. Uloga HP GG u formulaciji u kombinaciji sa MMW CS, odnosno sa NH, zbog slabo izraženog mukoadhezivnog karaktera, jeste povećanje viskoziteta suznog filma čime se produžava kontakt i pospešuje interakcija NH, odnosno pozitivno naelektrisanog hitozana sa negativno naelektrisanim mucinom. Rezultati dobijeni oscilatornom reološkom analizom ukazali su na fizičko preplitanje polimernih lanaca i glikoproteinskih lanaca mucina i stvaranje slabih vodoničnih veza između ukrštenih lanaca, što je potvrđeno merenjem odgovarajućih viskoelastičnih parametara. 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 u nastavku eksperimentalnog rada. 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 HP GG (0,25%, m/V) sa NH (0,4%, m/V) i navedene pojedinačne polimere u odgovarajućim koncentracijama (ukupno pet različitih vehikuluma).

Drugi deo prikazuje rezultate ispitivanja fizičko-hemijskih i funkcionalnih karakteristika kapi za oči sa model lekovitim supstancama, iz grupe antihistaminika, OLO i KF, izrađenih uz korišćenje pet odabranih vehikuluma. Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) i infracrvenom spektroskopijom sa Furijevom transformacijom (FT-IR) utvrđeno je da su odabrane lekovite supstance kompatibilne sa polimerima prisutnim u odabranim vehikulumima. Nisu zabeležene značajne hemijske interakcije u fizičkim smešama model lekovitih supstanci i polimera. Promene na termogramima fizičkih smeša lekovitih supstanci i polimera, u smislu pomeranja karakterističnih pikova i snižavanje vrednosti entalpija koje odgovaraju topljenju lekovitih supstanci, poticale su isključivo od elektrostatičkih interakcija između suprotno naelektrisanih funkcionalnih grupa i formiranja vodoničnih veza. Sve navedeno potvrđeno je i analizom FT-IR spektara. Takođe, analiza fizičkih smeša kombinacija polimera pokazala je da nije bilo značajnih interakcije između polimera u smeši koje bi uticale na njihove fizičko-hemijske ili funkcionalne karakteristike. Rezultati dobijeni merenjem površinskog napona, ugla kvašenja i izračunate vrednosti koeficijenta rasprostiranja, ukazuju na mogućnost lakšeg kvašenja i bržeg rasprostiranja ispitivanih formulacija 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 produženo delovanje lekovite supstance. Rezultati procene permeabilnosti OLO i KF na dva HCE-T ćelijska modela različitih barijernih funkcija bili su u saglasnosti sa hemijskom prirodom lekovitih supstanci i karakteristikama upotrebljenih modela. Očekivano više vrednosti koeficijenta permeabilnosti za obe model supstance dobijene su na višeslojnom Modelu I koji karakteriše slabije izražena barijerna funkcija i daleko niži transepitelni električni otpor nego u slučaju Modela II. Niže vrednosti koeficijenta permeacije dobijene su za OLO (red veličine 10^{-7} cm/s) u odnosu na KF (red veličine 10^{-5} cm/s) na oba HCE-T modela, zbog izraženijeg lipofilnog karaktera KF. Formulacije sa MMW CS su imale više koeficijente permeacije u slučaju obe model supstance i na oba korišćena HCE-T modela, zbog poznatog uticaja MMW CS na slabljenje čvrstih veza između HCE-T epitelnih ćelija i interakcije MMW CS sa fosfolipidima ćelijske membrane, što je dovelo do poboljšanja penetracije lekovitih supstanci. Sa druge strane, ispitivane formulacije kapi za oči bez MMW CS u sastavu, imale su slične ili niže koeficijente permeacije u odnosu na referentne formulacije. Prividni permeacioni koeficijenti dobijeni izvođenjem PAMPA testa bili su u opsegu $35,9-81,1 \times 10^{-7}$ za OLO i $13,7-25,0 \times 10^{-5}$ za KF. Dobijene vrednosti bile su nešto više od vrednosti izmerenih ispitivanjem permeabilnosti na

ćelijskim modelima što je ukazalo na mogućnost primene PAMPA testa za 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 °C i 22 ± 1°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.

Rezultati dobijeni u *trećoj fazi eksperimentalnog rada*, tokom koje su sprovedene studije biokompatibilnosti izvođenjem MTT testa i *in vivo* studija procene efikasnosti ispitivanih kapi za oči, su prikazani u potpoglavlju *Rezultati treće faze eksperimentalnog rada*. U slučaju formulacija koje sadrže OLO, došlo je do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija nakon njihovog izlaganja formulacijama koje sadrže samo HP GG kao polimer (85,9 ± 5,3%) odnosno NH (87,9 ± 6,3%). Nešto niže smanjenje vijabilnosti ćelija, ali i dalje statistički značajno različito od kontrolne grupe, zapaženo je nakon inkubacije ćelija sa formulacijom koja je u svom sastavu imala samo MMW CS od polimera (90,5 ± 4,5%). Najviši nivo vijabilnosti koji se statistički nije razlikovao od kontrolne grupe dobijen je nakon inkubacije ćelija sa formulacijama koje su sadržavale kombinacije polimera (96,9 ± 3,4%, za HP GG-MMW CS, odnosno 100,7 ± 6,2%, za HP GG-NH). Visoka vijabilnost HCE-T ćelija postignuta je nakon inkubacije sa formulacijama kapi za oči sa KF (91,6 ± 3,5% – 99,9 ± 3,6%). Vijabilnost ćelija se značajno razlikovala ($p < 0,05$) u odnosu na vijabilnost kontrolne grupe ćelija, samo nakon inkubacije sa formulacijom koja je sadržavala MMW CS (91,6 ± 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 ± 3,6% (HP GG-MMW CS), odnosno 99,2 ± 3,7% (HP GG-MMW CS). 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 zbog odgovarajućih fizičko-hemijskih i funkcionalnih osobina, izraženog sinergizama kombinacije polimera na reološke i mukoadhezivne karakteristike, te odsustva citotoksičnosti. Sve formulacije su dovele do statistički značajnog smanjenja broja pokreta prednje šape (antinociceptivno delovanje) i zadnje šape (antipruritusno delovanje), nakon primene histamina u donju konjunktivalnu vrećicu miševa. U slučaju OLO, ispitivane formulacije ostvarile su izraženije antipruritusno i antinociceptivno dejstvo u odnosu na komercijalni preparat, ali je statistički značajna razlika zabeležena samo kod formulacije koja je sadržavala kombinaciju polimera HP GG-MMW CS. Obe kombinacije polimera su značajno doprinele intenzitetu i dužini trajanja antipruritusnog delovanja KF, što se moglo zaključiti na osnovu postojanja statistički značajne razlike u broju epizoda češanja između novih i referentne formulacije. Sličan odgovor, ali manje izražen, zabeležen je i pri praćenju antinociceptivnog efekta ispitivanih formulacija KF. Kombinacije polimera korišćene u pripremi novih 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.

3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Najveće ograničenje u okularnoj isporuci lekovitih supstanci je niska raspoloživost koja predstavlja posledicu kratkog vremena zadržavanja lekovitog preparata na oku i aktivnosti barijernih funkcija oka. Zbog toga se poslednjih decenija intenzivno radi na uvođenju različitih fizičkih i hemijskih modifikacija postojećih farmaceutskih oblika namenjenih za oftalmološku primenu [1]. Jedan od prvih, a sa aspekta izrade najjednostavnijih, pristupa u modifikaciji tečnih farmaceutskih preparata za oftalmološku primenu (kapi za oči) koji je korišćen i u ovoj doktorskoj disertaciji, podrazumeva dodavanje polimera u formulaciju. Hidrofilni polimeri, uglavnom polisaharidi, ulaze u sastav određenih lekovitih preparata (kapi za oči, hidrogelovi) i medicinskih sredstava koji se već nalaze na tržištu [2-4]. Njihova osnovna uloga ogleda se u sposobnosti povećanja viskoziteta suznog filma i odupiranja drenažnom sistemu oka, dok određeni polimeri poseduju i mukoadhezivna svojstva, pri čemu stupaju u interakciju sa mucinom na površini oka i tako produžavaju vreme zadržavanja preparata na mestu primene i poboljšavaju okularnu raspoloživost, a time i terapijsku efikasnost lokalno aplikovanih lekovitih supstanci [5]. Neki od polimera koji predstavljaju predmet istraživanja ove doktorske disertacije već ulaze u sastav značajnog broja registrovanih lekovitih preparata i medicinskih sredstava iz grupe preprata za negu i vlaženje oka (dervati celuloze, NH), dok sa druge strane preostali korišćeni polimeri nalaze se u sastavu malog broja medicinskih sredstava iz navedene grupe (HP GG) ili uopšte nisu prisutni u preparatima koji su dostupni na tržištu (CS) [2, 3]. U literaturi postoje brojne potvrde o pozitivnom reološkom sinergizmu i poboljšanom mukoadhezivnom efektu kombinacije polimera u odnosu na korišćenje pojedinačnih polimera u formulaciji. Kombinacijom dva ili više polimera moguće je postići više pozitivnih efekata, značajnije doprineti viskozitetu i lubrikaciji, uz smanjenje koncentracije pojedinačnih polimera, te na taj način umanjiti mogućnost pojave neželjenih efekata [6-9]. Do sada su u literaturi opisani pozitivni sinergistični efekti kombinacija CS i NH [7], HP GG i ksantan gume [10], NH i HP GG [9], ali ne postoje literaturni navodi o korišćenju kombinacije CS i derivata GG. Oftalmološki vehikulumi koji su bili predmet istraživanja prve faze eksperimentalnog rada, pored navedenih pojedinačnih polimera, sadržavali su i četiri kombinacije polimera (HEC-HPMC, HP GG-HEC, HP GG-MMW CS i HP GG-NH). Rezultati merenja viskoziteta već su ukazali na sinergistički efekat polimera, pa je vrednost prividnih viskoziteta vehikuluma koji sadrže kombinacije polimera značajno viši od zbira vrednosti viskoziteta za vehikulume koji sadrže pojedinačno iste polimere u istim koncentracijama.

Literaturni podaci ukazuju na dobro izražena mukoadhezivna svojstva NH i CS [5] što je potvrđeno i rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji. Kada su u pitanju mukoadhezivna svojstva derivata celuloze, u literaturi se pronalaze oprečni podaci, od onih koji HEC svrstavaju u mukoadhezivne polimere [11], do onih koji navode da nejonski celulozni etri imaju slabo izražene mukoadhezivne karakteristike [12], što je potvrđeno i dobijenim rezultatima.

Tokom ispitivanja stabilnosti formulisanih vehikuluma nakon procesa sterilizacije parom, dobijeni su rezultati koji su u saglasnosti sa podacima u literaturi. Prethodne studije su pokazale da sterilizacija parom značajno utiče na rastvore CS, naročito na njihov viskozitet i molekulsku masu [13, 14]. Takođe, u literaturi postoje podaci da toplota tokom sterilizacije dovodi do promena u prividnom viskozitetu i vremenski zavisnom proticanju i kod rastvora HEC [15]. U literaturi se navodi da GG ispoljava reverzibilno smanjenje viskoziteta nakon izlaganja temperaturi [15], što je takođe potvrđeno merenjem viskoziteta nakon 28 dana stajanja vehikuluma sa kombinacijom HP GG-NH na sobnoj temperaturi. Na osnovu dobijenih rezultata, data je preporuka da se izrada ovakve vrste oftalmoloških vehikuluma vrši

pod aseptičnim uslovima, unutar komore sa laminarnim protokom vazduha uz korišćenje pomoćnih supstanci odgovarajućeg mikrobiološkog kvaliteta [16-18].

Termalnom i spektroskopskom analizom utvrđena je kompatibilnost model lekovitih supstanci (OLO i KF) sa korišćenim polisaharidnim polimerima, kao i kompatibilnost međusobno kombinovanih polimera, što do sada u literaturi nije bilo predmet izučavanja.

Pored viskoziteta preparata i sposobnosti adhezije za površinu oka, za poboljšanje okularne raspoloživosti bitna je i njegova površinska aktivnost [19]. Značaj kontrolisanja površinskog napona i kontaktnog ugla u cilju obezbeđenja dobre podnošljivosti, sposobnosti rasprostiranja i zadržavanja tečnog preparata na mestu primene, prepoznat je tokom sprovedenih istraživanja. Utvrđeno je da su formulacije sa OLO imale nešto niži površinski napon (43,3–54,6 mN/m) od formulacija sa KF (49,9–72,7 mN/m), što je u skladu sa literaturnim podacima. U jednoj od prethodnih studija koju su sprovedeli Brockman i sar. [20], pokazano je da OLO i KF imaju izraženu površinsku aktivnost, pri čemu KF pokazuje veći afinitet za interakcije sa međupovršinom argon/voda, ali i sa fosfolipidnim monoslojem, u odnosu na OLO. U navedenoj studiji izmereni maksimalni površinski napon za OLO (koncentracija pufera 5 mM u rastvoru) 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). Pored površinske aktivnosti lekovitih supstanci, u ovoj doktorskoj disertaciji naglasak je stavljen i na već poznatu površinsku aktivnost upotrebljenog konzervansa, benzalkonijum-hlorida [19], ali i upotrebljenih polimera o čijoj površinskoj aktivnosti u literaturi nema značajnijih podataka. Potvrđena je umerena površinska aktivnost HP GG koja se pominje u literaturi [21], ali i izostanak površinske aktivnosti MMW CS i NH [22, 23].

Pored već navedenog formulacionog pristupa primene mukoadhezivnih polimera koji produžavaju vreme zadržavanja na mestu primene, sledeći formulacioni pristup koji se koristi sa ciljem poboljšanja okularne raspoloživosti nakon lokalne primene je dodavanje pojačivača penetracije koji poboljšavaju penetraciju kroz rožnjaču modifikovanjem suznog filma i mukusnog sloja, te modifikovanjem lipidnog dvosloja membrana ili slabljenjem čvrstih međućelijskih veza (engl. *tight junctions*) [24, 25]. U velikom broju studija [26-28], korišćen je upravo hitozan, sam ili u kombinaciji sa drugim polimerima, što je slučaj i u formulacijama koje su predmet istraživanja ove doktorske disertacije, u kojima je MMW CS korišćen kao biokompatibilni i biodegradabilni polimer sa višestrukim ulogama.

Biofarmaceutska karakterizacija oftalmoloških preparata je specifična i zahtevna za sprovođenje zbog osetljivosti i kompleksnih anatomsko-fizioloških karakteristika oka, stoga se konstantno radi na razvoju i usavršavanju postojećih, ali i pronalasku novih tehnika [29, 30]. Jedna od njih, korišćena u ovoj disertaciji, podrazumeva primenu *in vitro* ćelijskih modela za procenu permeabilnosti, kao i biokompatibilnosti. Modeli uzgojeni na bazi besmrtnih ćelijskih linija zasnovane na humanim epitelnim ćelijama rožnjače (engl. *human corneal epithelial cells*, HCE-T) poseduju brojne prednosti u odnosu na *in vivo* i *ex vivo* metode zbog niskih troškova, lakog i brzog izvođenja, mogućnosti ponavljanja i većeg broja ispitivanih uzoraka, boljeg razumevanja toksičnosti na ćelijskom i molekularnom nivou i što je najbitnije, smanjenje broja žrtvovanih životinja [31-33].

Nakon uporedne analize dobijenih rezultata u studiji permeabilnosti na dva različita HCE-T modela za vrednosti P_{app} za OLO i prethodno objavljenih rezultata permeacione studije sprovedene na Franz-ovoj difuzionoj ćeliji uz korišćenje sveže izolovane rožnjače koze, može se zaključiti da su oni bili za jedan do dva reda veličine viši ($1,36 \times 10^{-5}$ cm/s) [34]. Ispitivana formulacija *in situ* gela, u pomenutoj studiji, sadržavala je takođe pojačivač penetracije, benzododecinijum-bromid, koji deluje kao surfaktant i povećava penetraciju OLO.

U literaturi se navode različiti podaci za vrednosti P_{app} u slučaju KF, ali istog reda veličine kao rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji. Najčešće su prikazane studije koje podrazumevaju primenu *ex vivo* izolovane rožnjače laboratorijskih životinja. U studiji koju su realizovali Soltani i sar. [35] izvršeno je ispitivanje koeficijenta permeacije (K_p , cm/min) ketotifena iz Eudragit® nanočestica kroz izolovanu rožnjaču goveda korišćenjem Franz-ove difuzione ćelije. Dobijene vrednosti K_p KF kretale su se u rasponu $1,1-2,9 \times 10^{-5}$ cm/min, odnosno $1,1-4,8 \times 10^{-6}$ 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 [7]. 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 pojedinih formulacija kapi za oči ispitivanih u okviru doktorske disertacije [7].

Pored navedenih *in vitro* modela baziranih na ćelijskim kulturama, još jedna *in vitro*, ali bezćelijska tehnika, korišćena je za predviđanja permeabilnosti model lekovitih supstanci kroz rožnjaču, a radi se o testu permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (engl. *Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay*, PAMPA) [30]. S obzirom da se PAMPA test u oblasti oftalmoloških preparata primenjuje u studijama tek poslednje 2-3 godine, postoji svega nekoliko naučnih radova koji daju smernice za sprovođenje ove metode i vrednosti P_{app} za nekolicinu supstanci koje se koriste za lečenje oboljenja oka, ne postoji mogućnost poređenja dobijenih rezultata, naročito jer je reč o viskoznim polisahardinim formulacijama koje se značajno razlikuju od jednostavnih vodenih rastvora lekovitih supstanci. Ono što je svakako potvrđeno rezultatima dobijenim sprovođenjem PAMPA testa jeste uloga MMW CS kao pojačivača penetracije koji ne deluje samo tako što dovodi do reverzibilnog otvaranja i slabljenja čvrstih međućelijskih veza, kako se najčešće navodi u literaturi, nego može povećati permeabilnost kroz ćelijsku membranu zbog elektrostatičkih interakcija amino grupe sa fosforil grupama fosfolipidnih komponenata ćelijskih membrana, što je potvrđeno kod bakterija [36]. Takođe, pokazano je da MMW CS dovodi do lokalne distorzije fosfolipidnih lanaca usled kombinacije elektrostatičkih, dipolnih i hidrofobnih interakcija [37].

Dobijeni rezultati u studiji biokompatibilnosti, zadovoljavajuće nizak citotoksični efekat korišćenih polisaharidnih polimera, u saglasnosti su sa ranijim rezultatima predstavljenim u literaturi. Literaturni podaci ukazuju na odsustvo iritacije ili vidljivih nepoželjnih promena u morfologiji epitela rožnjače ili konjunktive nakon ispitivanja različitih formulacija CS u *in vitro* (HCE ćelije rožnjače i NHC-IOBA ćelije konjunktive) i *in vivo* studijama [38, 39]. Takođe, zadovoljavajući nivo vijabilnosti ćelija dobijen je nakon tretiranja modela epitela rožnjače baziranog na CEPI 17 ćelijskoj liniji, veštačkim suzama koje su sadržavale HP GG [40]. U velikom broju *in vitro* i *in vivo* studija potvrđena je dobra podnošljivost i odsustvo potencijalnih neželjenih iritacionih ili citotoksičnih efekata [41-43].

Za procenu efikasnosti novih formulacija antihistaminika za oftalmološku primenu *in vivo* u literaturi su opisani različiti modeli alergijskog konjunktivitisa postavljeni uglavnom na glodarima, zamorcima [44, 45] i miševima [46, 47] kao animalnim subjektima. Prednosti testa svraba izazvanog histaminom u prekliničkim ispitivanjima navedeni su u literaturi, a dobijeni rezultati su u skladu sa ranijim podacima o svrabu i blagim nociceptivnim senzacijama koje proizvodi jontoforeski primenjeni histamin kod ljudi. Nociceptivno ponašanje, koje se manifestuje pokretanjem prednjih udova, primećeno je nakon ukapavanja histamina u oko, ali u manjem obimu u odnosu na ponašanje izazvano svrabom, odnosno grebanje zadnjim udovima što je u potpunosti u skladu sa literaturnim navodima, da se pored svraba kao najčešćeg simptoma alergijskog konjunktivitisa, može javiti i osećaj bola koji je obično

prouzrokovan snažnim grebanjem površine oka, pre svega rožnjače [48]. Zabeležena antinociceptivna svojstva koja su naglašenija kod formulisanih kapi za oči sa OLO i KF nego uporedo ispitivanih komercijalnih preparata, 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.

Sagledavajući sveobuhvatno rezultate predstavljene u ovoj doktorskoj disertaciji, može se zaključiti da su u saglasnosti sa podacima iz literature, a deo rezultata koji se odnosi na određena ispitivanja sprovedena u okviru disertacije se mogu smatrati doprinosom istraživačkog rada kandidata jer do sada nisu opisana u literaturi.

LITERATURA:

- [1] M. Chowhan, J.C. Lang, P. Missel, Ophthalmic preparations, in: Felton, L. (Ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, London, 2012.
- [2] <https://www.alims.gov.rs/ciril/lekovi/pretrazivanje-humanih-lekova/> (poslednji pristup 28. septembar 2021)
- [3] <https://www.alims.gov.rs/ciril/medicinska-sredstva/pretrazivanje-medicinskih-sredstava/> (poslednji pristup 28. septembar 2021)
- [4] 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.
- [5] N. Dubashynskaya, D. Poshina, S. Raik, A. Urtili, Y.A. Skorik, Polysaccharides in ocular drug delivery, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 22.
- [6] 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. Pharm. Biopharm.*, 57 (2004) 465-472.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] M.A. Chowhan, H. Chen, Ophthalmic compositions containing a synergistic combination of two polymers, Google Patents, 2011.
- [10] 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.

[11] T. Velpandian, *Pharmacology of ocular therapeutics*, Springer, 2016.

[12] A. Ludwig, The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57 (2005) 1595-1639.

[13] 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.

[14] L.Y. Lim, E. Khor, C.E. Ling, Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 48 (1999) 111-116.

[15] 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.

[16] The European Pharmacopoeia 10th Edition, 2020., Strasbourg: Council of Europe; 2020.

[17] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-sterilisation-medicinal-product-active-substance-excipient-primary-container_en.pdf (poslednji pristup 28. septembar 2021)

[18] T. Velpandian, U.S. Das, *Extemporaneously Used Drug Formulations for Ocular Emergencies*, *Pharmacology of Ocular Therapeutics*, Springer, 2016, pp. 385-418.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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, pp. 147-175.

- [25] R.V. Moiseev, P.W.J. Morrison, F. Steele, V.V. Khutoryanskiy, Penetration Enhancers in Ocular Drug Delivery, *Pharmaceutics*, 11 (2019).
- [26] H. Gupta, S. Jain, R. Mathur, P. Mishra, A.K. Mishra, T. Velpandian, Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system, *Drug Deliv.*, 14 (2007) 507-515.
- [27] H. Gupta, M. Aqil, R. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, G. Mittal, S. Jain, Development and Characterization of ^{99m}Tc-timolol Maleate for Evaluating Efficacy of In Situ Ocular Drug Delivery System, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 10 (2009) 540-546.
- [28] Aameduzzafar, S.S. Imam, S.N.A. Bukhari, A. Ali, Preparation and evaluation of novel chitosan: gelrite ocular system containing besifloxacin for topical treatment of bacterial conjunctivitis: scintigraphy, ocular irritation and retention assessment, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 46 (2018) 959-967.
- [29] R.T. Addo, *Ocular drug delivery: advances, challenges and applications*, Springer, 2016.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *Int. J. Food Microbiol.*, 95 (2004) 147-155.

- [37] 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.
- [38] M. de la Fuente, M. Raviña, 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] Y. Nakazawa, M. Oka, M. Takehana, Model for studying anti-allergic drugs for allergic conjunctivitis in animals, *Open Med.*, 12 (2017) 231-238.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.

4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije do sada su objavljeni u dva rada u međunarodnim naučnim časopisima sa SCI liste, jednom istaknutom nacionalnom časopisu i deset saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u celini ili u izvodu. Podaci o publikovanim radovima i saopštenjima dati su u nastavku.

Raćić 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.

- a. **Naziv časopisa:** European Journal of Pharmaceutical Sciences
- b. **Impakt faktor (2019):** 3,616
- c. **Kategorija:** M21
- d. **Rang časopisa u oblasti Pharmacology & Pharmacy:** 77/271

Raćić 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.

- a. **Naziv časopisa:** Journal of Drug Delivery Science and Technology
- b. **Impakt faktor (2019):** 2,734
- c. **Kategorija:** M22
- d. **Rang časopisa u oblasti Pharmacology & Pharmacy:** 132/271

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):

Raćić A, Krajišnik D, Jančić-Stojanović B, Čalija B, Milić J. Određivanje rastvorljivosti olopatadin-hidrohlorida primjenom tečne hromatografije hidrofилnih 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. Balatonfured, 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.

5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Predmet naučnog istraživanja bila je formulacija biokompatibilnih, viskoznih vehikuluma za oftalmološku primenu (sa lubrikantnim i mukoadhezivnim svojstvima), na bazi polisaharidnih polimera: HEC, HPMC, HP GG, LMW CS, MMW CS, NH, kao potencijalnih nosača za lekovite supstance iz grupe antihistaminika (OLO i KF), te njihova fizičko-hemijska i biofarmaceutska karakterizacija.

Razmatrajući prikazane rezultate paralelno s podacima navedenim u teorijskom, uvodnom delu ove doktorske disertacije, može se izvesti zaključak da su uspešno razvijeni biokompatibilni polisaharidni mukoadhezivni vehikulumi koji se zbog svojih lubrikantnih svojstava mogu koristiti u tretmanu sindroma suvog oka, ali i kao nosači za odabrane model lekovite supstance različitih fizičko-hemijskih karakteristika. Nakon procene reoloških karakteristika pri ambijentalnim i simuliranim fiziološkim uslovima, mukoadhezivnih svojstava, sveobuhvatne fizičko-hemijske karakterizacije, odabrano je 5 vehikuluma koji su korišćeni za izradu kapi za oči sa model lekovitim supstancama. Očekuje se da će odabrani vehikulumi odgovarajućeg viskoziteta, zahvaljujući svojstvima upotrebljenih polimera, ispoljiti lubrikantni efekat na površini oka. Dodatno, 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, što će pored mukoadhezivnosti omogućiti duže zadržavanje na mestu primene.

Kroz rezultate dobijene sveobuhvatnom fizičko-hemijskom karakterizacijom, analizom interakcija između lekovitih supstanci i korišćenih polimera, kao i ispitivanjem stabilnosti razvijenih viskoznih kapi za oči dodatno je potvrđena pogodnost primene polisaharidnih polimera u formulaciji tečnih oftalmoloških preparata. Polimeri upotrebljeni u kombinaciji pokazuju više sinergističkih efekata, kako na viskozitet tako i na mukoadhezivne karakteristike, u čemu se posebno ističe kombinacija MMW CS i HP GG koja do sada nije opisana u literaturi i predstavlja jedan od glavnih doprinosa ove doktorske disertacije.

Pored toga, na iste zaključke upućuju i rezultati *in vitro* i *in vivo* ispitivanja permeabilnosti, biokompatibilnosti i efikasnosti u otklanjanju svraba kao najčešćeg simptoma alergijskog konjunktivitisa, što je procenjeno uporedo sa ispitivanjem referentnih preparata sa tržišta. Pozitivan sinergistički efekat je potvrđen ispitivanjem biokompatibilnosti, pri čemu je najviši nivo vijabilnosti humanih epitelnih ćelija rožnjače zabeležen upravo kod formulacija koje su sadržavale kombinacije polimera (HP GG-MMW CS i HP GG-NH). Utvrđeno je da su sve ispitivane kapi za oči sa OLO i KF obezbedile ublažavanje simptoma veštački izazvanog alergijskog konjunktivitisa primenom rastvora 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 polimera, te se nameće kao potencijalno dobar nosač za OLO za okularnu primenu. U slučaju KF, obe kombinacije

polimera su povećale efikasnost i dužinu trajanja antipruritusnog efekta KF. Na osnovu ovih rezultata, obe kombinacije polisaharidnih polimera bi mogle da se razmotre kao potencijalno novi nosači za oftalmološku primenu KF.

Na kraju, veliki doprinos doktorske disertacije predstavlja primena savremenih tehnika korišćenih za procenu permeabilnosti lekovitih supstanci kroz modele rožnjače koji se zasnivaju na ćelijskim HCE-T modelima i paralelnim veštačkim membranama (PAMPA test), a koje do sada nisu primenjivane za sličan tip formulacija. Rezultati ispitivanja permeabilnosti ukazali su na veliki značaj i prednost jednostavnih *in vitro* tehnika koje se ogledaju u jednostavnosti, reproduktivnosti, ponovljivosti i mogućnosti testiranja velikog broja uzoraka, ali i smanjenju troškova i vremena potrebnog za izvođenje eksperimenata. Kao racionalno razvijen, PAMPA test, bez prisustva ćelija, zasnovan na primeni samo fosfolipida, može se 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. Dodatno, tako dobijene rezultate moguće je koristiti u cilju procene uticaja upotrebljenih polimera na permeabilnost lekovitih supstanci.

Sveukupno gledajući, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o:

- (a) sinergističkim efektima polisaharidnih polimera na reološke i mukoadhezivne karakteristike preparata i moguće korišćenje nižih koncentracija pojedinačnih polimera;
- (b) prednostima primene polisaharidnih polimera u viskozim kapima za oči za isporuku lekovitih supstanci u odnosu na konvencionalne kapi za oči u obliku vodenih rastvora;
- (c) značaju odabira odgovarajućih metoda za procenu mukoadhezivnih karakteristika u zavisnosti od tipa i mehanizma interakcija polimera i mucina;
- (d) primeni i odgovarajućoj optimizaciji studija permeabilnosti na dva različita ćelijska modela zasnovana na humanim ćelijama epitela rožnjače i bezćelijskom modelu, zasnovanom samo na fosfolipidima;
- (e) mogućnosti korišćenja navedenih modela kao diskriminatornih tehnika u smislu procene uticaja prisustva hitozana kao pojačivača penetracije, kako na *in vitro* ćelijskom modelu kod kojeg se očekivalo delovanje hitozana na čvrste međućelijske veze, tako i na PAMPA modelu gde je potvrđen uticaj hitozana na fosfolipidni dvosloj i
- (f) unapređenom terapijskom efektu model lekovitih supstanci olopatadina i ketotifena u prisustvu kombinacija polisaharidnih polimera.

6 PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Procedura provere originalnosti doktorske disertacije odložena je usled kašnjenja u nabavci softvera za proveru originalnosti, koja se odvija pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a postupak pisanja i usvajanja izveštaja komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije, prema preporuci rektorke Univerziteta u Beogradu prof. dr Ivanke Popović od 27.09.2021. treba da se odvija nesmetano i nezavisno od pomenute okolnosti. Izveštaj o proveri originalnosti biće dostavljen čim se obezbede uslovi da se softverska provera sprovede.

7 Predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat dipl. farm. Anđelka Račić uspešno realizovala postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji „Polisaharidni mukoadhezivni vehikulumi kao nosači za lekovite supstance iz grupe antihistaminika za oftalmološku primenu“ urađenoj pod mentorstvom vanr. prof. dr Danine Krajišnik, predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti farmaceutске tehnologije.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u jednom radu u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednom radu u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), u jednom radu u časopisu nacionalnog značaja (M52) i većem broju saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu, stoga, pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dipl. farm. Anđelke Račić i predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Polisaharidni mukoadhezivni vehikulumi kao nosači za lekovite supstance iz grupe antihistaminika za oftalmološku primenu“.

Članovi Komisije:

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

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

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

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

5.

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

U Beogradu, 01.10.2021.