Konzervansi u topikalnim lijekovima za oko

Papst Lopac, Andrea

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:978921

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Andrea Papst Lopac

KONZERVANSI U TOPIKALNIM LIJEKOVIMA ZA OKO

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: doc.dr.sc. Ivan Pepić

Specijalistički rad obranjen je dana 4. studenog 2016. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. Dr. sc. Ivan Pepić, doc., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2. Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, izv. prof., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

3. Dr. Sc. Marijana Erceg, znanstv. sur., PLIVA Hrvatska d.o.o., Zagreb

Rad ima 100 listova.

PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem svojem mentoru na stručnoj pomoći oko izrade ovog specijalističkog rada. Hvala kompaniji HALMED što mi je omogućila upis poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova s ciljem mojeg profesionalnog razvoja.

Veliko hvala mojoj obitelj kojoj posvećujem ovaj specijalistički rad.

SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog rada je pregledno opisati standardne i suvremene konzervanse, prikazati farmakopejsko ispitivanje antimikrobne učinkovitosti konzervansa te raspraviti pretkliničke i kliničke aspekte sigurnosti njihove primjene u topikalnim oftalmičkim pripravcima.

Materijali i metode:

Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Ciljana pretraga provedena je na bazama MEDLINE/PubMed, Science Direct, Google pretraživaču, na stranicama Agencije za lijekove i medicinske proizvode, putem znanstvenih članaka te dostupnim dokumentima proizvođača i pretraživanjem patenata. Literaturni pregled obuhvaća razdoblje do rujna 2016. godine i oslanja se na javnodostupne baze.

Rezultati:

Topikalni oftalmički lijekovi su sterilni farmaceutski oblici koji se najčešće pakiraju u višedozne spremnike i sadrže prikladan konzervans u odgovarajućoj koncentraciji radi sprječavanja sekundarne mikrobiološke kontaminacije lijeka.

Dugotrajna upotreba topikalnih oftalmičkih lijekova može izazvati toksične ili alergijske oftalmičke nuspojave, odnosno jatrogene bolesti oka, a može ih uzrokovati bilo koja pomoćna (primjerice, konzervans) ili djelatna tvar sadržana u oftalmičkom lijeku.

Benzalkonijev klorid (BAK) je konzervans koji se najčešće koristi u topikalnim oftalmičkim lijekovima. Mogući štetni učinci BAK ovise o vremenu i dozi primjene. S ciljem prevladavanja nedostataka BAK razvijaju se suvremeni konzervansi ili načini pakiranja topikalnih oftalmičkih lijekova.

Zaključak:

S obzirom da primjena kapi za oko bez dodatka konzervansa ima znatno manje izražene nuspojave u odnosu na primjenu konzerviranih kapi za oko, kod pacijenata koji boluju od kroničnih bolesti oka i/ili imaju oštećenu površinu oka uputno je primjenjivati kapi za oko bez dodatka konzervansa.

SUMMARY

Objectives:

The aim of this work is to describe standard and modern preservatives, pharmacopeic testing of antimicrobial effectiveness of preservatives and discuss preclinical and clinical safety aspects of their use in topical ophthalmic preparations.

Materials and methods:

Targeted literature search was done on MEDLINE / PubMed, Science Direct, Google search engine, website and database of Croatian Agency for Medicinal Products and Medical Devices, articles in the research journals, available documents of manufacturers and patents. The database searching of the scientific literature includes period up to October 2016.

Results:

A topical ophthalmic medicinal products are sterile pharmaceutical forms which are most often packaged in multidose containers containing a preservative, in a suitable concentration for the prevention of secondary microbial contamination of the drug.

Long-term use of topical ophthalmic medicinal products can cause toxic ophthalmic side effects or allergy, but also iatrogenic diseases of the eye, and they may be caused by any excipient (e.g., preservative) or the active substance contained in an ophthalmic medicinal product.

Benzalkonium chloride (BAK) is a preservative commonly used in topical ophthalmic medicinal products. Possible adverse effects of BAK depend on the duration and dose of application. With the aim of overcoming the disadvantages of BAK, modern preservatives or inovative packaging of topical ophthalmic medicinal products are being developed.

Conclusion:

Since the application of eye drops without preservatives has significantly less pronounced side-effects as compared to administration of the preserved eye drops, in patients with chronic diseases of the eye and / or with a damaged ocular surface it is advisable to apply eye drops without preservatives.

Sadržaj

1. UVOD ... 3
1.1. Oftalmička primjena lijekova ... 3
1.2. Biološke barijere oka ... 4
1.3. OFTALMIČKI OBLICI LIJEKOVA ZA LIJEČENJE OBOLJENJA PREDNJEG SEGMENTA OKA ... 8
1.3.1. Kapi za oko ... 10
1.3.2. Losioni za oko ... 11
1.3.3. Prašci za kapi za oko ili prašci za losioni za oko ... 12
1.3.4. Polučvrsti pripravci za oko ... 12
1.3.5. Umetci za oko ... 13
1.4. POMOĆNE TVARI ZA IZRADU OFTALMIČKIH PRIPRAVAKA ... 14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 22
3. MATERIJALI I METODE ... 23
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 25
4.1. Najčešći uzročnici mikrobiološke kontaminacije oftalmičkih pripravaka - bakterije, gljivice i virusi ... 25
4.2. Kemijska klasifikacija oftalmičkih konzervansa ... 31
4.3. Pregled konzervansa u oftalmičkim pripravcima ... 37
4.4. Farmakopejska ispitivanja antimikrobne učinkovitosti konzervansa u oftalmičkim pripravcima ... 51
4.5. Učinak površinski aktivnih tvari u oftalmičkim pripravcima na antimikrobnu učinkovitost konzervansa ... 54
4.6. SIGURNOST PRIMJENE KONZERVANSA U OFTALMIČKIM PRIPRAVCIMA ... 56
4.6.1. Pretklinička ispitivanja sigurnosti primjene (*in vitro* i *ex vivo* metode) ... 56
4.6.2. Klinička ispitivanja sigurnosti primjene (*in vivo* metode) ... 57
4.6.3. Čimbenici koji utječu na sigurnost primjene konzervansa ... 60
4.7. OFTALMIČKE NUSPOJAVE POVEZANE S PRIMJENOM KONZERVANSA ... 65
4.7.1. Konzervansi i spojnica oka ... 65
4.7.2. Konzervansi i suzni film ... 66
4.7.3. Konzervansi i rožnica ... 66
4.7.4. Konzervansi i alergije ... 70
4.7.5. Konzervansi i kontakne leće ... 71
4.7.6. Konzervansi kao uzročnici jatrogenih bolesti oka ... 73
4.7.7. Ostale nuspojave koje uzrokuje BAK – Sindrom suhog oka i površinske bolesti oka ... 73

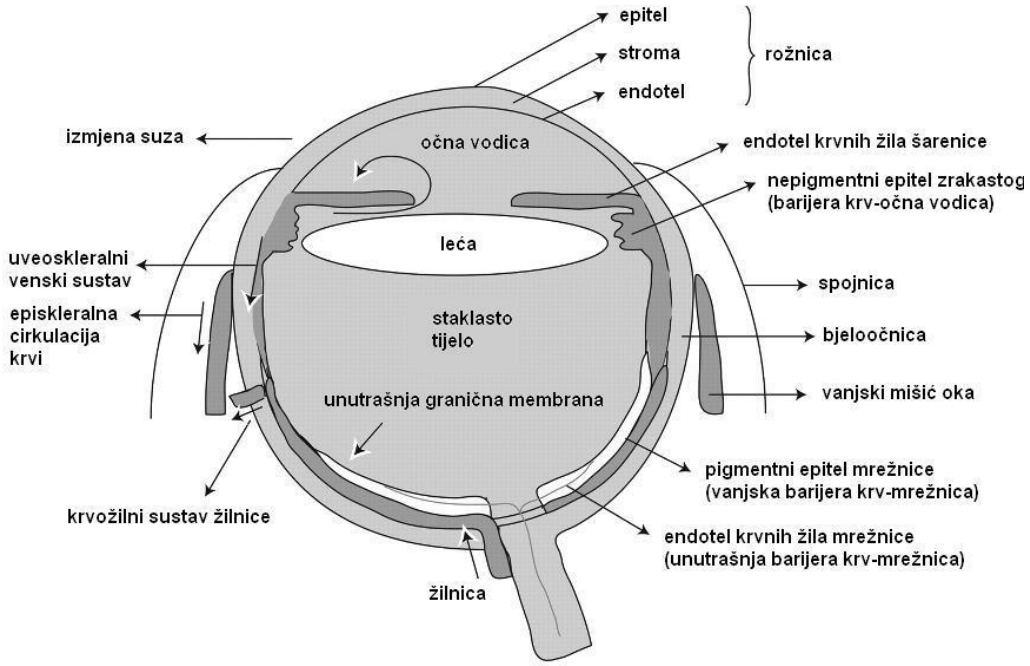
4.8. ALTERNATIVNI OFTALMIČKI PRIPRAVCI BEZ DODATKA KLASIČNIH KONZERVANSA 75
4.8.1. Inovativni konzervansi 76
4.8.2. Jednodozni spremnici oftalmičkih lijekova bez konzervansa 78
4.8.3. Višedozni spremnici oftalmičkih lijekova bez konzervansa 80
4.8.4. Suvremeni višedozni spremnici kapi za oko 80
5. ZAKLJUČAK 82
6. LITERATURA 86
KRATICE 93
7. ŽIVOTOPIS 94

1. UVOD

1.1. Oftalmička primjena lijekova

Oko je organ vida koji je podložan brojnim bolestima od kojih neke mogu dovesti do trajnog oštećenja vida. Lokalna primjena lijeka na površinu oka je jednostavna, neinvazivna i najbolje prihvaćena od strane pacijenata te je već duže vrijeme prvi izbor u farmakoterapiji bolesti oka. Kontaminacija oftalmičkog pripravka predstavlja opasnost od potencijalno teške infekcije oka, kao i promjena farmaceutskog oblika lijeka. Većina oftalmičkih pripravaka je pakirana u višedozne spremnike. Europska farmakopeja propisuje da topikalni oftalmički pripravci moraju biti sterilno proizvedeni i da moraju sadržavati antimikrobno sredstvo (konzervans), ako pripravak sam po sebi nema odgovarajuće antimikrobno djelovanje, kako bi se nakon otvaranja spremnika lijeka spriječila sekundarna kontaminacija (1).

Najčešći uzrok sekundarne kontaminacije je nepravilno rukovanje sa spremnikom (najčešće bočicom) ili kontakt vrha bočice/kapaljke s dijelovima oka. Također, postoji rizik od kontaminacije kada istu bočicu lijeka za oko dijeli nekoliko bolesnika, osobito u bolničkom okruženju ili unutar iste obitelji. Upravo je ova vrsta incidenta 1960-te godine u bolnici u Birminghamu u Velikoj Britaniji potaknula britanske vlasti da industriji lijekova postave zahtjev za razvoj prvih jednodoznih spremnika i da se tako ograniči rok trajanja upotrebe nakon otvaranja. S obzirom da je proizvodnja jednodoznih spremnika i pripravaka zahtjevnija i ujedno manje isplativa nego proizvodnja višedoznih bočica kapi za oko, od 1960-ih godina najveći napredak postignut je upravo u području razvoja konzervansa. Međutim, tek u 1970-im godinama je dodatak antimikrobnog sredstva u bilo koje višedozne oftalmičke pripravke postao obavezan (2).



Slika 1. Biološke barijere oka (prilagođeno prema literaturnom navodu (3))

1.2. Biološke barijere oka

Ljudsko oko predstavlja veliki izazov učinkovitoj lokalnoj primjeni lijeka. Uzrok tome je anatomska građa oka, odnosno očnih tkiva te različiti fiziološki zaštitni mehanizmi (slika 1). Pojednostavljeno, oko možemo podijeliti na dva segmenta. Prednji segment oka (rožnica, spojnica, bjeloočnica, šarenica, zjenica i cilijarno tijelo) koji je ujedno i dinamičko područje oka, te stražnji segment (leća, staklasto tijelo, mrežnica, žilnica, optički živac i krvožilni sustav) koji se opisuje kao statičko područje (3).

Glavne barijere prednjeg segmenta oka predstavljaju rožnica (*cornea)* i spojnica (*tunica conjuctiva*). Rožnica je nevaskularna barijera čiji je lipofilni epitel višeslojan (5–6 slojeva u sredini; 8–10 slojeva prema periferiji) i građen od tijesno priljubljenih skvamoznih stanica (3).

Apsorpcija lijeka preko rožnice je ograničena s tri barijere: vanjski lipofilni epitel, središnja hidrofilna stroma i unutrašnji lipofilni endotel (slika 2). Epitel rožnice se regenerira i zato se pri ozljedi epitela ne stvaraju ožiljci niti rožnica gubi providnost. Hidrofilna stroma rožnice (*substantia propria*) sastoji se od vlakana kolagena te stanica fibrocita i keratinocita bez kontinuirane strukture. Unutrašnji lipofilni

endotel građen je od jednog reda skvamoznih ili kubičnih stanica bogatih mitohondrijima koje su odgovorne za regulaciju protoka tekućine i hranjivih tvari između očne vodice i strome rožnice (3).

Druga barijera, smještena na prednjem segmentu oka, je spojnica. Glavna uloga spojnice je zaštitna, a služi i kao pasivna fizička barijera. Građena je od epitela i strome. Epitel je višeslojan (5–15 slojeva stanica) i cilindričan, prekriven mikrovilima, te sadrži vrčaste stanice koje izlučuju sluz (*mucus*). Stroma spojnice sadrži krvne i limfne žile, živce, žlijezde i njihove izvodne kanale. Ukoliko lijek dođe do tog sloja moguća je sistemska apsorpcija i razvoj sistemskih nuspojava. Rožnica i spojnica moraju biti stalno vlažne da bi obavljale svoju funkciju. Ovlažuju ih suze, koje stalno luče suzne žlijezde (*glandulae lacrimalis*). Suze su bistra izotonična otopina s približno 98% vode, 0,6% bjelančevina te 0,9% elektrolita i vitamina A i C. Sadrže enzim lizozim koji smanjuje bakterijsku aktivnost u konjuktivalnom prostoru. Iz vrčastih stanica spojnice izlučuje se sluzava tvar mucin, koji izlučen na površinu rožnice i spojnice stvara sloj gela. Na sloj mucina nastavlja se vodeni sloj s elektrolitima, proteinima i suspendiranim lipidima. Sve je pokriveno lipofilnim površinskim slojem, kojeg izlučuju žlijezde lojnice spojnice (Meibomove žlijezde), a uloga mu je spriječiti prekomjerno isparavanje s očne površine (slika 2). Opisani slojevi oblikuju prekornealni suzni film koji je važan za normalnu funkciju očne površine, uključujući njezinu vlažnost, transparentnost, optičku kvalitetu i vanjsku zaštitu. Suzni film se obnavlja treptanjem, a ljudsko oko prosječno trepne 20 puta u minuti. Prekornealno područje oka posjeduje fiziološke mehanizme koji fizički odstranjuju strane čestice s površine oka, ali i primijenjene oftalmičke pripravke. Takvi mehanizmi uključuju dinamiku suzne tekućine, vezanje lijeka na proteine suzne tekućine i njegovu razgradnju (4). Također pojačanim treptanjem odstranjuje se višak volumena primijenjenog pripravka, a ostatak tog volumena se uz pomoć suzne tekućine brzo drenira u nazolakrimalni kanal te time primijenjena doza lijeka postaje manja od terapijske doze i apsorbira se u sistemsku cirkulaciju. Opisanim mehanizmima lijek se uklanja s površine oka za manje od 30 sekundi (5).

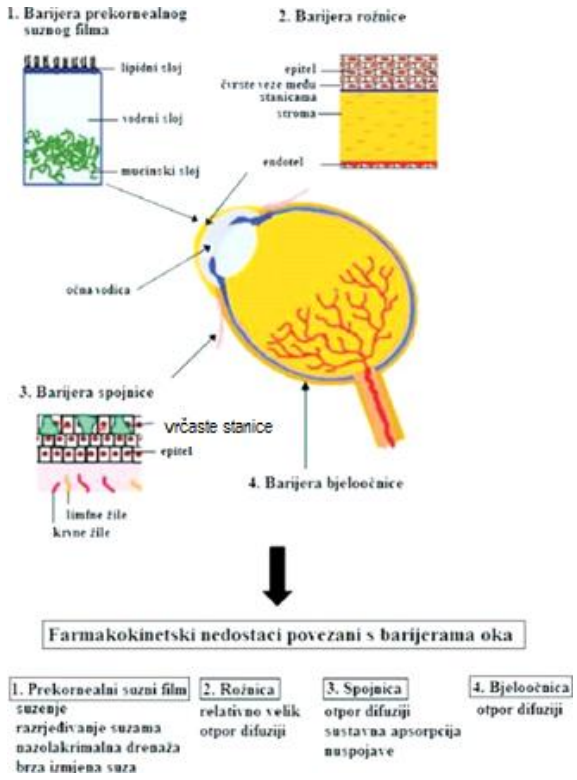
Bjeloočnica je također još jedna očna barijera koja pruža visok otpor difuziji. Građena je od gustih kolagenskih i pojedinih elastičnih vlakana, proteoglikana, proteina, stanica i vode (3).

Lijek koji je primijenjen sistemski ili periokularno, dospijeva do barijera stražnjeg segmenta oka. To su zapravo fiziološke barijere koje sprječavaju ulazak štetnih tvari i proteina iz sistemske cirkulacije u

očnu vodicu i staklasto tijelo i tako održavaju njihovu providnost. Također imaju ulogu fizičkih barijera jer čine prepreku između krvi i tkiva oka. Razlikujemo dvije vrste takvih barijera: krv-očna vodica i krv-mrežnica (3).

Barijera krv-očna vodica sastoji se od epitela, krvnih žila šarenice i endotela krvnih žila srednje očne ovojnice, a njezina uloga pri fiziološkim uvjetima je održavanje sastava očne vodice sprječavajući prijenos tvari i makromolekula iz sistemske cirkulacije u očnu vodicu. Također, utječe na metabolizam rožnice i leće te pomaže u regulaciji volumena tekućina prisutnih u oku. Druga barijera stražnjeg segmenta oka, krv-mrežnica, sprječava ulazak stranih tvari iz kapilara žilnice u mrežnicu. Takva barijera podijeljena je na unutrašnju barijeru koju čini endotelna membrana krvnih žila i vanjsku barijeru koju čini pigmentni epitel mrežnice na površini mrežnice prema žilnici. Pigmentni epitel mrežnice građen je od tijesno priljubljenih stanica koje su gusto zbijene i čvrsto povezane te reguliraju transepitelni prijenos tvari (6) (7).

Osim nabrojenih barijera, očna tkiva sadrže metaboličke enzime kao što su esteraze i aldehid reduktaze, koji mogu ubrzati razgradnju lijeka te smanjiti njegovo djelovanje (8).



Slika 2. Barijere prednjeg segmenta oka (prilagođeno prema literaturnom navodu (9))

Nakon lokalne primjene pripravka na površinu oka većina se terapijski značajnih oftalmika (uglavnom male lipofilne molekule) apsorbiraju u oko preko rožnice (transkornealna apsorpcija) čija je površina relativno mala (1,04 cm^2). Prijenos tvari kroz epitel rožnice odvija se aktivno i pasivno. Pasivni prijenos uključuje difuziju tvari niz koncentracijski gradijent (transcelularno ili paracelularno bez posredovanja proteina) ili olakšanu difuziju (posredovanjem proteina nosača ili kanalnih proteina).

Osim spomenute transkorenalne apsorpcije lijeka kroz rožnicu, hidrofilni i/ili makromolekulski lijekovi se apsorbiraju paracelularnim putem (kroz čvrste veze između stanica, odnosno kroz hidrofilne pore). Za paracelularni put se također natječu ioni suzne tekućine kojima je izložena površina oka. Hidrofilnim lijekovima je epitel rožnice ograničavajući čimbenik apsorpcije, a stroma i endotel samo djelomično usporavaju njihovu permeaciju. Transkornealnu apsorpciju lijeka otežava vezanje ili zadržavanje lijeka u slojevima rožnice (3).

Lijek se može apsorbirati i nekornealnim putem, odnosno preko spojnice i bjeloočnice. Epitel spojnice je ograničavajući čimbenik apsorpcije lijekova preko spojnice, ima 2 puta veće pore paracelularnog puta i 16 puta veću gustoću takvih pora u odnosu na epitel rožnice (3).

1.3. OFTALMIČKI OBLICI LIJEKOVA ZA LIJEČENJE OBOLJENJA PREDNJEG SEGMENTA OKA

Većina klasičnih oftalmičkih farmaceutskih oblika je jednostavna. Obično se lijekovi topljivi u vodi primjenjuju u obliku vodenih otopina, dok se netopljivi lijekovi primjenjuju u obliku ljekovitih masti za oko i suspenzija. Glavni nedostaci klasičnih oftalmičkih farmaceutskih oblika su loša bioraspoloživost, masovna apsorpcija po primjeni, sustavne nuspojave zbog nazolakrimalne drenaže, neučinkovitost (neinvazivne) primjene lijeka u stražnje segmente očnog tkiva. Loša bioraspoloživost posljedica je relativne nepermeabilnosti epitelne membrane rožnice, dinamike suza, nazolakrimalne drenaže i visoke učinkovitosti krvno-očne barijere. Masovna apsorpcija po primjeni farmakokinetska je osobina povezana s kapima za oči. Iz toga proizlazi kratki početni period u kojemu je koncentracija lijeka u oku iznad terapijske koncentracije, nakon čega slijedi dugi period u kojemu je koncentracija lijeka ispod terapijske koncentracije. Kapi za oči ne ostaju dovoljno dugo u dodiru s površinom oka (apsorpcijskom membranom) i moraju se učestalo primjenjivati. Prednost suspenzijskih oblika je produljeni dodir s površinom oka, a nedostatak je mogućnost iritacije i posljedično izazivanje suzenja, što povećava nazolakrimalnu drenažu i eliminaciju oblika iz prekornealnog područja. Prednost je ljekovitih masti za oči produljeni dodir s površinom oka i povećana stabilnost pri skladištenju, a nedostatak je zamućenje vida. Lokalna primjena lijeka u stražnje segmente oka ograničena je prethodno navedenim mehanizmima, a parenteralna primjena ograničena krvno-mrežničnom barijerom. Stoga su uvijek metode izbora primjene lijeka u stražnje segmente oka lokalne injekcije (intrakameralne, retrobulbarne) (4).

Oftalmički su oblici lijekova jedan od najvažnijih i široko razvijenih područja farmaceutske tehnologije više desetaka godina. Glavni razlog za snažan interes znanstvenika za takve oblike lijekova su njihovi, već opisani, glavni nedostaci. Primarna uloga razvoja oftalmičkih oblika lijekova je postizanje optimalne koncentracije lijeka na mjestu apsorpcije i produljenje vremena zadržavanja lijeka na mjestu djelovanja, što zauzvrat pridonosi smanjenju učestalosti primjene (10).

Izazov je napraviti farmaceutski oblik koji će osigurati prijenos lijeka kroz barijeru prednjeg segmenta oka, a istovremeno neće trajno naštetiti oku. Uz bioraspoloživost, formulator također mora uzeti u obzir podnošljivost i stabilnost konačnog proizvoda. Konvencionalni oftalmički dozni oblici mogu se razvrstati u nekoliko kategorija: vodene otopine, suspenzije, gelovi i masti. Unatoč brojnim kritikama o učinkovitosti klasičnih oblika, kao što je ograničena bioraspoloživost, takvi oblici i dalje čine većinu komercijalnih proizvoda (11).

U posljednjih nekoliko desetljeća, raznolikost konvencionalnih oftalmičkih farmaceutskih oblika je postupno evoluirala, šireći se van jednostavnih rješenja, te sada uključuje različite načine primjene lijeka. Proširuje se pojam konvencionalnih sustava za primjenu lijeka u oko koji je dosad obuhvaćao jednostavne otopine i suspenzije (12).

Nekonvencionalni farmaceutski oblici za liječenje oboljenja prednjeg segmenta oka obuhvaćaju različite oftalmičke umetke i kontaktne leće te terapijske mikro/nano sustave za oftalmičku primjenu (10)(11).

Prema Europskoj farmakopeji oftalmički oblici lijekova za liječenje oboljenja prednjeg segmenta oka mogu se podijeliti na nekoliko kategorija (1):

1. kapi za oko
   - otopine
   - suspenzije
   - emulzije
2. losioni za oko
3. prašak za kapi za oko i prašak za losione za oko
4. polučvrsti pripravci za oko
   - masti
   - kreme
   - gelovi
   - umetci za oko.

1.3.1. Kapi za oko

Kapi za oko sterilne su vodene ili uljne otopine, emulzije ili suspenzije jedne ili više djelatnih tvari namijenjene za primjenu u oko. Mogu sadržavati pomoćne tvari, primjerice, za prilagodbu toničnosti ili viskoznosti pripravka, za prilagodbu ili održavanje pH vrijednosti, za povećanje topljivosti djelatne tvari ili povećanje stabilnosti pripravka. Takve tvari ne utječu nepovoljno na namijenjeni medicinski učinak pripravka ili, u uporabljenim koncentracijama, ne izazivaju neprimjerenu lokalnu iritaciju (1).

Vodene oftalmičke otopine proizvode se otapanjem djelatne tvari i ostalih pomoćnih tvari te se zatim steriliziraju toplinskim postupcima ili sterilnom filtracijom (11). Vodeni pripravci pakirani u višedozne spremnike sadrže prikladan konzervans u odgovarajućoj koncentraciji, osim ako sam pripravak ima primjerena antimikrobna svojstva. Izabrani konzervans mora biti kompatibilan s ostalim tvarima u pripravku i učinkovit u vremenu u kojem se rabe kapi za oko. Ako kapi za oko ne sadrže konzervans, pakiraju se u jednodozne spremnike ili u višedozne spremnike koji sprečavaju mikrobno onečišćenje nakon otvaranja. Kapi za oko namijenjene za uporabu u kirurškim zahvatima ne sadrže konzervans. Kapi za oko, otopine, promatrane pri prikladnom osvjetljenju, praktički su bistre i praktički bez čestice (1).

Kapi za oko, suspenzije mogu imati talog koji se brzo raspršI nakon protresanja i pritom nastaje suspenzija dostatno stabilna da omogući ispravno doziranje (1).

Suspenzije su vrlo učinkovit i važan oftalmički dozirni oblik za hidrofobne i teško topljive lijekove.

Suspenzije su kinetički stabilni, ali termodinamički nestabilni sustavi, kod kojih, kad dugo miruju, može doći do agregacije čestica, sedimentacije i stvaranja teško redispergirajućeg sedimenta. Veličina je čestica važna za fizičku stabilnost i bioraspoloživost lijeka u većini oftalmičkih suspenzija, a u većini oftalmičkih suspenzija veličina čestica je manja od 10 mikrometara. Najučinkovitija metoda proizvodnje čestica takve veličine je mljevenje. Izrada uključuje sterilizaciju mikroionizirane djelatne tvari suhim vrućim zrakom, izlaganjem gama zračenju ili etilen dioksidu, a u nekim slučajevima i sterilizaciju vodenom parom nakon čega slijedi kuglično mljevenje (11).

Mikroemulzije su obećavajući suvremeni farmaceutski oblici lijekova, jeftini za proizvodnju, jednostavni za sterilizaciju i stabilni, istovremeno pružaju mogućnost uklapanja veće količine djelatne tvari. Klinička ispitivanja na zdravim dobrovoljcima pokazala su produljeno razdoblje učinkovitosti i povećanje bioraspoloživosti lijekova koji se primjenjuju u takvim oblicima. Mehanizam djelovanja uključuje adsorpciju „nano kapi“ koje su spremnik za lijek i unutarnje fazu mikroemulzije na površini rožnice, što ograničava prelijevanje. Djelatne tvari za koje su razvijene mikroemulzije su difluprednat, ciklosporin A, flurbiprofen aksetil koji je prolijek flurbiprofena (10).

Višedozni pripravci pakirani su u spremnike koji omogućuju uzastopnu primjenu pripravaka u obliku kapi. Ako nije drugačije opravdano i odobreno, spremnici sadrže najviše 10 ml pripravka. U označivanju lijeka, za višedozne spremnike, navodi se vrijeme nakon otvaranja spremnika, u kojem se mora iskoristiti njegov sadržaj. Ako nije drugačije opravdano i odobreno, to vrijeme iznosi najviše 4 tjedna. Također, tijekom razvoja, mora se pokazati da se nazivni sadržaji može izvući iz spremnika tekućih i polukrutih pripravaka za oko, pakiranim u jednodoznim spremnicima (1).

1.3.2. Losioni za oko

Losioni za oko su sterilne vodene otopine namijenjene za pranje ili ispiranje oka ili za impregnirane obloge za oko. Losioni za oko mogu sadržavati pomoćne tvari, kao što su tvari za prilagodbu toničnosti ili viskoznosti pripravka ili za prilagodbu i održavanje pH vrijednosti. Takve tvari ne utječu nepovoljno na namijenjeni učinak pripravka ili, u uporabljenim koncentracijama, ne izazivaju neprimjerenu lokalnu iritaciju. Losioni za oko pakirani su u višedozne spremnike koji sadrže konzervanse u odgovarajućoj koncentraciji, osim ako sam pripravak ima antimikrobna svojstva. Izabrani konzervans mora biti kompatibilan s ostalim tvarima u pripravku i učinkovit kroz razdoblje u kojem se rabe losioni za oko. Ako losioni za oko ne sadrže konzervans, pakiraju se u jednodozne spremnike. Losioni za oko namijenjeni za primjenu u kirurškim zahvatima i u prvoj pomoći, ne sadrže konzervans i pakirani su u jednodozne spremnike. Losioni za oko, promatrani pri prikladnom

osvjetljenju, praktički su bistri i praktički bez čestica. Ako nije drugačije opravdano i odobreno, spremnici za višedozne pripravke ne sadrže više od 200 ml losiona za oko (1).

1.3.3. Prašci za kapi za oko ili prašci za losione za oko

Prašci za pripravu kapi ili losiona za oko izrađuju se u suhom, sterilnom obliku namijenjenom za otapanje ili suspendiranje u prikladnoj tekućoj podlozi neposredno prije primjene. Mogu sadržavati pomoćne tvari koje olakšavaju otapanje ili raspršivanje, sprječavaju skrutnjavanje, ili tvari za prilagodbu toničnosti, za prilagodbu ili održavanje pH vrijednosti ili tvari koje povećavaju stabilnost pripravka. Nakon otapanja ili suspendiranja u propisanoj tekućini, kad je primjereno, udovoljavaju zahtjevima za kapi za oko i losione za oko (1).

1.3.4. Polučvrsti pripravci za oko

Polučvrsti pripravci za oko sterilne su masti, kreme ili gelovi namijenjeni za nanošenje na konjuktivu ili na vjeđu. Sadrže jednu ili više djelatnih tvari koje su otopljene ili raspršene u prikladnoj podlozi. Imaju homogeni izgled. Podloga ne iritira spojnicu oka. U proizvodnji pripravaka za oko koji sadrže raspršene čestice, poduzimaju se mjere kojima se osigurava prikladna i kontrolirana veličina čestica, uzimajući u obzir namijenjenu uporabu pripravka (1).

Masti su oftalmički dozni oblik koji se najčešće koristi za noćnu terapiju i kada je potrebno produženo djelovanje. Najveća mana im je što zamućuju vid zbog razlike u indeksu refrakcije između suza i nevodene prirode masti te zbog neprikladnog doziranja. Najčešće se izrađuju tako da se djelatna tvar usitnjava mikronizacijom i sterilizira se suhim vrućim zrakom, etilen dioksidom ili gama zračenjem. Konzervansi, ako su potrebni, poput klorbutanola ili parabena otapaju se u smjesi rastaljenog vazelina i tekućeg parafina koja se hladi na približno 40° C uz stalno mješanje kako bi se osigurala homogenost. Sterilizirana i mikronizirana djelatna tvar se dodaje aseptički u toplu steriliziranu smjesu vazelina i tekućeg parafina uz stalno miješanje do postizanja homogenosti (11).

Gelovi su oftalmički dozni oblici koji omogućavaju lokaliziranu dostavu lijeka na površinu oka. Vrlo često imaju svojstvo bioadhezije. Takvi polimeri produljuju vrijeme kontakta lijeka i površine oka te na taj način poboljšavaju okularnu bioraspoloživost. Izbor vrste polimera najvažniji je čimbenik u kinetici oslobađanja lijeka iz doznog oblika, a dostupno je nekoliko polimera različitih mukoadhezivnih svojstava. Takav se gel proizvodi konvencionalnim metodama izrade. Glavni korak je priprema polimernog gela pri višoj koncentraciji nakon čega slijedi autoklaviranje. Djelatna tvar i ostale pomoćne tvari se otope u vodi i sterilne filtriraju u gel, pH se namjesti aseptički te se proizvod puni u sterilne tube (11).

Polučvrsti pripravci za oko pakirani su u male, sterilizirane tube koje se mogu istisnuti, a opremljene su steriliziranom kanilom. Ako nije drugačije opravdano i propisano, tube ne sadrže više od 10 g pripravka. Tube moraju biti dobro zatvorene da se izbjegnu mikrobna onečišćenja. Polučvrsti pripravci za oko također mogu biti pakirani u prikladne jednodozne spremnike. Spremnici ili otvori tuba su takvog oblika da se može nanijeti pripravak bez kontaminacije (1).

1.3.5. Umetci za oko

Umetci za oko su sterilni, čvsti ili polučvrsti pripravci odgovarajuće veličine i oblika namijenjeni za umetanje u konjuktivalnu vrećicu kako bi se postigao učinak u prednjem segmentu oka. Uglavnom se sastoje od spremišta djelatne tvari, koje se nalazi u matriksu ili je vezano za membranu kojom se postiže kontrolirano oslobađanje djelatne tvari. Djelatna tvar, koja je relativno topljiva u suznoj tekućini, postupno se oslobađa iz pripravka kroz određeno vrijeme. Umeci za oko pakirani su pojedinačno u sterilne spremnike (1).

1.4. POMOĆNE TVARI ZA IZRADU OFTALMIČKIH PRIPRAVAKA

Oftalmičkim lijekovima više čimbenika određuje bioraspoloživost u oku, a koncentracija lijeka u krvi ne govori dovoljno o njegovoj intraokularnoj koncentraciji i terapijskom učinku. Učinak pomoćnih tvari je često presudan za bioraspoloživost lijeka iz oftalmičkog pripravka, jer se pripravak primjenjuje izravno na površinu oka preko koje se lijek apsorbira do mjesta terapijskog učinka. Bioraspoloživost lijeka nakon oftalmičke primjene usko je povezana s njegovim biofarmaceutskim svojstvima (npr. topljivost u tekućinama oka i prekornealnog područja, permeabilnost kroz biološke barijere oka, metabolička stabilnost). Izotoničnost, konzervansi, pH, indeks refrakcije, površinska napetost i viskoznost pripravka značajno utječu na permeabilnost oftalmika. Dobra podnošljivost pripravka na površini oka također utječe na bioraspoloživost lijeka. Pripravci koji su neugodni pri primjeni potiču suzenje i treptanje zbog čega se lijek uklanja s mjesta apsorpcije čime se smanjuje vrijeme permeacije preko barijere oka. Neprimjerena toničnost oftalmičkog pripravka na površini oka stvara osmotski gradijent zbog čega se epitelne stanice spojnice dehidriraju što mijenja svojstva permeabilnosti barijere oka. Udjel konzervansa (npr. benzalkonijevog klorida) u pripravku značajno mijenja permeabilnost lijeka, a moguće utječe i na sigurnost primjene pripravka. Indeks refrakcije pripravka treba biti što sličniji indeksu refrakcije suzne tekućine i rožnice (1,34 – 1,36) da pripravak pri primjeni ne ometa vid. Pripravci površinske napetosti niže od površinske napetosti suzne tekućine (40 – 50 mN/m) dobro se šire po rožnici i miješaju s prekornealnim suznim filmom što poboljšava dodir pripravka i površine oka, odnosno permeabilnost lijeka. Oblici relativno niskih viskoznosti poput oftalmičkih otopina (najčešće 20 mPa s) dobro se podnose i istodobno brzo uklanjaju s površine oka što rezultira lošom bioraspoloživoću lijeka. Optimalno poboljšanje bioraspoloživosti osiguravaju pseudoplastični oblici s viskoznošću do 150 mPas. Oblici veće viskoznosti zamućuju vid i pružaju otpor gibanju vjeđa pri treptanju te su manje učinkoviti u smanjivanju nazolakrimalne drenaže i stabiliziranju suznog filma (3).

Pomoćne tvari u oftalmičkim pripravcima možemo razvrstati u nekoliko kategorija:

- Sredstva za puferiranje
- Sredstva za izotonizaciju
- Voda za injekcije i pročišćena voda
- Sredstva za konzerviranje (konzervansi)
- Sredstva za prilagođavanje viskoznosti
- Sredstva za pojačavanje apsorpcije
- Sredstva za solubilizaciju i močenje

Prema rezultatima analize lijekova dostupnih u Physicians' Desk Reference for Ophthamology (izdanje 1995.), sumirani su oftalmološki lijekovi dostupni u SAD-u u smislu dostupnosti doznih oblika. Otopine, masti i suspenzije čine skoro 90% svih dostupnih formulacija što je vidljivo iz tablice 1 (12).

Tablica 1. Konvencionalni farmaceutski oblici (prilagođeno prema literaturnom navodu (12).

Farmaceutski oblik	Broj	Udjel (%)
Gel	2	0,7
Injekcije	11	3,8
Umetci za oko	11	3,8
Masti	50	17,4
Oralni oblici	9	3,1
Otopine	179	62,4
Suspenzije	25	8,7

Tablica 2 pregledno prikazuje pomoćne tvari koji se koriste u tri najčešće korištena farmaceutska oblika oftalmičkih lijekova. X označava da je sirovina uključena ili često uključena u farmaceutski oblik, Y označava izbornu sirovinu. Složenost oftalmičkih farmaceutskih oblika je vidljiva iz tablice 2, kod kojih je broj sastojaka velik kao i mogućnost različitih interakcija. Svaka pomoćna tvar koja je dodana u farmaceutski oblik u određenoj koncentraciji u svrhu poboljšanja određenog svojstva pripravka, često je u interakciji s jednim ili više sastojaka. Rijetko kada će farmaceutski oblici sadržavati sve navedene pomoćne tvari, međutim podloga oftalmičkog pripravka određuje vrstu i

očekivanu ulogu pomoćne tvari. Utjecaj sastavnica smjese na međusobne kemijske aktivnosti dobro je poznat, a u oftalmičkim pripravcima se na taj način može postići željeni učinak na prijenos lijeka, stabilnost, te u konačnici učinkovitost (12).

Tablica 2. Pomoćne tvari u konvencionalnim oftalmičkim farmaceutskim oblicima (prilagođeno prema literaturnom navodu (12))

Opis pomoćne tvari	Otopina	Suspenzija	Mast
Djelatna tvar	X	X	X
Nosač djelatne tvari	X	X	Y
Voda	X	X	
Sredstvo za puferiranje	X	X	
Konzervans	X	X	Y
Sredstvo za izotonizaciju	Y	Y	
Soli	Y	Y	
Sredstvo za povećanje viskoznosti	Y	Y	
Bioadhezivno sredstvo	Y	Y	
Emulgator			
Sredstvo za suspendiranje		Y	
Sredstvo za solubilizaciju	Y		
Promotori apsorpcije	Y	Y	
Vosak, vazelin, ulje			X
Umreženi polimer			

Sredstva za puferiranje

Izbor pH pripravka vrlo je važan jer su o pH ovisni topljivost, stabilnost i kornealna permeabilnost lijeka, ali i okularna podnošljivost. Ponekad, izbor prikladnog pufera optimizira bioraspoloživost lijeka i podnošljivost (10). Normalni pH suza je neutralan, reguliran tvarima otopljenim u suzama te se kreće se u rasponu od 7,14 do 7,82 s prosječnom vrijednošću sličnom pH vrijednosti plazme (7,4-7,5) (13). Optimalan je pH oftalmičkog pripravka 7,2 (3). Pri odlučivanju hoće li se lijek puferirati, treba uzeti u obzir stabilnost djelatne tvari i toleranciju tkiva na pripravak. U slučajevima kada se pH mora podrediti drugim farmaceutsko-tehnološkim zahtjevima (npr. topljivost lijeka) puferski kapacitet suzne tekućine relativno dobro održava pH unutar fizioloških vrijednosti pa se pripravci širokog pH raspona (npr. nepuferirani proizvodi pH < 4,0 ili pH > 8,0) relativno dobro podnose na površini oka (3).

Ipak, ako pH vrijednost izlazi izvan raspona pH 4 - 8 koji oko može podnijeti, pacijent će najćešće osjećati nelagodu, može se javiti iritacija, a bioraspoloživost lijeka može se smanjiti zbog povećanog suzenja oka (10). Za prilagodbu pH najčešće se koriste natrijev hidroksid za prilagodbu razine lužnatosti i kloridna kiselina za prilagodbu razine kiselosti.

Sredstva za izotonizaciju

Za izotonizaciju oftalmičkih otopina najčešće se koristi natrijev klorid, te nešto rjeđe manitol, sorbitol i glicerol.

D-manitol je osmotsko sredstvo niske molekularne mase, odnosno nereducirajući šećerni alkohol, izomer sorbitola. Provedeno je ispitivanje zaštitne uloge manitola na epitel rožnice čije oštećenje uzrokuje benzalkonijev klorid, koristeći epitel rožnice oka štakora i HCE-T staničnu liniju ljudskih epitelnih stanica rožnice. Dodatak manitola, u oftalmički pripravak timolol maleata koji je konzerviran benzalkonijevim kloridom, pospješio je brzinu zacjeljivanja rana rožnice oka. Također, kapi za oko koje su uz benzalkonijev klorid sadržavale i manitol se bolje podnose nego kapi za oko koje sadrže samo benzalkonijev klorid. Dodatno, u ispitivanju je pokazano da manitol nema negativan utjecaj na antimikrobnu aktivnost benzalkonijevog klorida protiv bakterije *E. coli* niti na kornealnu apsorpciju timolol maleata iz komercijalno dostupnih pripravaka (14).

Voda za injekcije (*Aqua ad iniectabilia*)

Voda za injekcije namijenjena je pripravi lijekova za parenteralnu primjenu kad se rabi kao pomoćno sredstvo (Voda za injekcije na veliko) i za otapanje ili razrjeđivanje tvari ili pripravaka za parenteralnu primjenu (sterilizirana voda za injekcije) (1).

Pročišćena voda (*Aqua purificata*)

Pročišćena voda je voda koja je namijenjena za pripravu svih lijekova koji moraju biti i sterilni i apirogeni, ako nije drugačije odobreno i opravdano. Pročišćena voda na veliko pripravlja se destilacijom, ionskom izmjenom, reverznom osmozom ili nekom drugom prikladnom metodom, od

vode koja udovoljava propisima za pitku vodu određenima u nadležnom tijelu. Pročišćena voda na veliko čuva se i distribuira u uvjetima koji sprječavaju rast mikroorganizama i onemogućuju bilo kakvo drugo onečišćenje. Pročišćena voda na spremnicima je pročišćena voda na veliko koja je napunjena i čuvana u uvjetima koji osiguravaju propisanu mikrobiološku čistoću. Ne sadrži ni jednu dodanu tvar (1).

Voda, visoko pročišćena (*Aqua valde purificata*)

Visoko pročišćena voda je voda namijenjena za uporabu u pripravi lijekova, za koje se traži voda visoke biološke kakvoće, ako nije propisana Voda za injekcije (1).

Konzervansi

Europska farmakopeja propisuje da se oftalmički lijekovi pripremaju i pakiraju tako da se osigura sterilnost nakon prve uporabe i održava tijekom upotrebe. Konzervansi su namijenjeni za sprječavanje mikrobnog onečišćenja lijeka pakiranih u višedoznim spremnicima (1). Međutim, s obzirom da mogu iritirati očna tkiva, uporaba konzervansa se ne preporučuje ili je čak isključena, u nekim slučajevima: kada se oftalmičke otopine koriste u kirurškim zahvatima, te kad pripravak ima primjerena antimikrobna svojstva. U tim slučajevima, oftalmičke otopine se pakiraju u jednodozne spremnike (15).

Većina kapi za oko sadrži konzervanse kako bi se osigurala antimikrobna zaštita otopine u bočici, ograničavajući sekundarne bakterijske i gljivične infekcije, kao i infekcije oka amebama (*Acanthamoeba*) uzrokovane kontaminiranom otopinom lijeka, te isti konzervansi produžuju rok valjanosti lijeka sprječavanjem biološke razgradnje (16).

Konzervansi se mogu kategorizirati u nekoliko skupina: površinski aktivne tvari (na primjer benzalkonijev klorid, klorobutanol), oksidansi (na primjer natrijev perborat), kelirajući agensi (na primjer metil paraben) i metabolički inhibitori (na primjer opsolentni tiomersal). Najučestalije korišteni oftalmički konzervans je benzalkonijev klorid, u koncentracijama u rasponu 0,015% do 0,05% (16).

Sredstva za prilagođavanje viskoznosti – polimeri

U tijeku tehnoloških istraživanja doznih oblika, predloženi su mnogi načini kako produljiti vrijeme trajanja kontakta tekućeg lijeka i tkiva oka, kao i povećanja apsorpcije djelatne tvari. Jedna od prvih promjena na konvencionalnim oblicima oftalmičkih lijekova je uvođenje polimera u pripravke, što je omogućilo dulje vrijeme kontakta djelatne tvari i površine rožnice, čime se povećava bioraspoloživost (10). Povećanje kornealne penetracije lijeka postiže maksimum pri viskoznosti pripravka od 15 do 150 mPa s (13). Primjer "ekstremne" uporabe tvari za povećavnje viskoznosti je formiranje gelova, što bi omogućilo smanjenje učestalosti primjene lijeka na jednom dnevno. Glavni nedostatak takvog farmaceutskog oblika je zamućenje vida, što negativno utječe na njegovu prihvatljivost među pacijentima (10).

Produljenje kontakta s rožnicom i poboljšanje bioraspoloživosti djelatne tvari je moguće dobiti povećanjem viskoznosti farmaceutskog oblika. Tvari koje imaju takav učinak su hidrofilni polimeri visoke molekularne mase koji ne prolaze kroz biološke membrane i formiraju trodimenzionalnu mrežastu strukturu u vodi. Primjeri takvih polimera uključuju polivinil alkohol, poloksamere, hijaluronsku kiselinu, karbomere, sintetske kopolimere polietilenoksida-polipropilenoksida-polietilenoksida (primjerice, poloksamer 407 je pogodan nosač pilokarpina u oftalmičkim pripravcima), te derivate celuloze (hidroksimetilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza i karboksimetilceluloza (11)) i kitozan (10).

Trenutno se hidrofilni polimeri koriste u mnogim oftalmičkim pripravcima, ali više kao spojevi koji pokazuju mukoadhezivna svojstva nego za povećanje viskoznosti. Takvi oblici sadrže polimere koji se povezuju nekovalentnim vezama s mucinom spojnice i obično su makromolekularni hidrokoloidi s mnogo hidrofilnih skupina (karboksilne, hidroksilne, amidne i sulfatne) koji mogu oblikovati elektrostatske veze, što omogućuje dulji kontakt s površinom oka. Mukoadhezivni oblik doziranja karakteriziran je većom bioraspoloživosti u usporedbi s uobičajenim oblicima (10).

Sredstva za promociju apsorpcije (promotori apsorpcije)

Dodatna mogućnost prilagodne bioraspoloživosti djelatne tvari u oftalmičkim pripravcima je uvođenje pomoćne tvari u farmaceutski oblik koji poboljšava prodiranje lijeka u očnu jabučicu. Tvari koje povećavaju permeabilnost epitelne membrane rožnice i prijenos lijeka u očna tkiva nazivaju se promotorima apsorpcije (17). Takve pomoćne tvari uključuju kelirajuća sredstva (na primjer kelator kalcijevih iona dinatrijev etilendiamintetraacetat (EDTA), površinski aktivne tvari (na primjer konzervans benzalkonijev klorid), te ciklodekstrine koji tvore komplekse s djelatnim tvarima. Na taj način se povećava topljivost, permeabilnost i bioraspoloživost slabo topljivih lijekova (10). Međutim, takve tvari pokazuju i lokalnu toksičnost, što je izazvalo ograničenja njihove uporabe u oftalmičkim lijekovima (10).

Klasični pojačivači apsorpcije imaju nespecifično djelovanje na biološke membrane; reverzibilno ili trajno oštećuju membrane pa im je sigurnost upitna. Novi promotori apsorpcije, poput ciklodekstrina, uvode se u cilju rješavanja problema sigurnosti. Ciklodekstrini djeluju kao nosači hidrofobnih molekula i nisu u mogućnosti modificirati permeabilnost biološke barijere (18).

Sredstva za močenje i solubilizaciju

Oftalmičke suspenzije sadrže mnoge pomoćne tvari kao što su sredstva za dispergiranje ili sredstva za močenje. Radi se površinski aktivnim tvarima koje smanjuju kut močenja između površine čvrste disperzne faze i tekućeg disperzijskog sredstva suspenzije. Općenito korištena sredstva za močenje i povećanje topljivosti prikazana su tablicom 3. Također, u takvu skupinu pomoćnih tvari pripadaju i sredstva za suspendiranje koja se koriste za sprječavanje taloženja, a što utječe na reološke značajke suspenzija. Idealna tvar za suspendiranje treba proizvesti strukturiranu podlogu, biti kompatibilna s drugim sastojcima farmaceutskog oblika i treba biti netoksična. Općenito, sredstva za suspendiranje oftalmičkih suspenzija uključuju derivate celuloze (kao što su metilceluloza, karboksimetilceluloza i hidroksipropilmetil celuloza) i sintetičke polimere (kao što su karbomeri, poloksameri i polivinil alkohol) (11).

Tablica 3. Sredstva za močenje i solubilizaciju (prilagođeno prema literaturnom navodu (11))

Benzalkonijev klorid
Benzetonij klorid
Cetilpiridinij klorid
Natrij lauril sulfat
Nonoksinol-9
Oktoksinol 9
Poloksamer
Polioksil 40 stearat
Polioksil 50 stearat
Polisorbat 20
Polisorbat 40
Polisorbat 60
Polisorbat 80
Sorbitan - monolaurat
Sorbitan - monooleat
Sorbitan - monopalmitat
Sorbitan - monostearat

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je izraditi pregledan opis standardnih i suvremenih konzervansa, prikazati farmakopejsko ispitivanje antimikrobne učinkovitosti konzervansa te raspraviti pretkliničke i kliničke aspekte sigurnosti njihove primjene u topikalnim oftalmičkim pripravcima.

Postavljene su dvije hipoteze:

Hipoteza 1: Korištenjem suvremenih konzervansa i/ili sustava za konzerviranje moguće je smanjiti učestalost oftalmičkih nuspojava topikalnih oftalmičkih lijekova.

Hipoteza 2: Topikalni oftalmički lijekovi bez dodatka konzervansa imaju bolji odnos rizika i koristi primjene lijeka u odnosu na topikalne oftalmičke lijekove koji su izrađeni uz dodatak konzervansa.

Detaljan opis odnosa rizika i koristi primjene standardnih i suvremenih konzervansa u topikalnim oftalmičkim lijekovima trebao bi doprinijeti izradi smjernica za ciljani razvoj novih konzervansa i/ili alternativnih načina pakiranja topikalnih oftalmičkih lijekova u jednodozne ili višedozne spremnike koji ne zahtijevaju primjenu konzervansa.

3. MATERIJALI I METODE

Kao materijal za izradu ovog teorijskog rada poslužili su znanstveni članci koji daju pregled konzervansa koji se trenutno koriste za antimikrobnu zaštitu topikalnih oftalmičkih pripravaka, njihovih svojstava i učinkovitosti, te popratnih učinaka na ljudsko oko. Također korišteni su i znanstveni članci koji opisuju suvremene konzervanse i metode za antimikrobnu zaštitu oftalmičkih lijekova.

Literatura je pretraživana prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Ciljana pretraga provedena je na bazama MEDLINE/PubMed, Science Direct, Google pretraživaču, te mrežnim stranicama Agencije za lijekove i medicinske proizvode, putem znanstvenih članaka te dostupnim dokumentima proizvođača i pretraživanjem patenata. Literaturni pregled obuhvaća razdoblje do rujna 2016. godine i oslanja se na javnodostupne baze prikazane u tablici 4.

Ključni pojmovi u pretraživanju su: oftalmički farmaceutski oblici, pomoćne tvari u oftalmičkim lijekovima, oftalmički konzervansi, benzalkonijev klorid, antimikrobna učinkovitost konzervansa, ispitivanja sigurnosti primjene konzervansa, suvremeni konzervansi, bolesti oka, nuspojave oftalmičkih lijekova, jatrogene bolesti oka.

Dodatna pretraživanja bila su putem specifičnih naziva proizvoda koji sadrže suvremene konzervanse ili suvremene višedozne spremnike oftalmičkih lijekova.

Pretraživanje gotovih proizvoda koji spadaju u domenu istraživanja ovog specijalističkog rada provedeno je putem baze lijekova dostupne na mrežnim stranicama Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED).

Tablica 4. Prikaz javnodostupnih baza korištenih za pretraživanje literature u svrhu izrade specijalističkog rada.

IZVOR	POVEZNICA
MEDLINE/PubMed (US National Library of Medicine)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
ScienceDirect	http://www.sciencedirect.com/
Medscape	http://www.medscape.com/pharmacists
HALMED	http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Najčešći uzročnici mikrobiološke kontaminacije oftalmičkih pripravaka - bakterije, gljivice i virusi

Oftalmičke otopine koje se višekratno koriste mogu se kontaminirati mikroorganizmima. Postotak kontaminacije oftalmičkih pripravaka, pregledom dostupnih ispitivanja, varira u velikom rasponu od 0,07% pa sve do 70%. Općenito je prihvaćeno da se mogućnost kontaminacije povećava što je dulji period korištenja lijeka. Također, na mogućnost onečišćenja velik utjecaj ima i starosna dob populacije koja koristi kapi za oko, a kao posljedica nepravilnog rukovanja spremnikom lijeka (19).

Unatoč propisanom ispitivanju učinkovitosti konzervansa u oftalmičkim pripravcima na određene mikroorganizme, ne može se isključiti mogućnost kontaminacije oftalmičkih pripravaka s drugim mikroorganizmima (15).
Oftalmički pripravci sterilni su prilikom prvog otvaranja spremnika. Kod pacijenata bez simptoma, a koji nose kontaktne leće, u otopinama za njegu leća pronađeni su brojni patogeni mikroorganzmi, čija se prisutnost povezuje s razvojem keratitisa i oštećenjem rožnice (20).

BAKTERIJE

Bakterijski keratitis je upala rožnice koja, u težim slučajevima, može oštetiti vid. Učestalost je deset puta veća u tropskim krajevima i zemljama u razvoju, u odnosu na umjerene klimatske zone i razvijeni svijet. Čimbenici rizika za razvoj bakterijskog keratitisa su nošenje kontaktnih leća, oštećenje rožnice, bolest površine oka, prethodna operacija oka ili kapaka, HIV infekcija i imunodeficijencija. Pacijenti oboljeli od bakterijskog keratitisa se žale na smanjenu sposobnost vida, bol u oku i osjetljivost na svijetlo. Klinički znakovi su promjene na rožnici koje se mogu obojiti fluoresceinom (21).

Patogene bakterije koje se mogu izolirati s korištenih bočica kapi za oko uglavnom su predstavnici ljudske mikrobiote kože i okoliša. No također, nešto rjeđe, izoliraju se i vrsta *Staphylococcus aureus*,

te gram-negativne vrste *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Serratia marcescens* (19). Iako kontaminacija kapi za oko nije česti uzrok upale oka, te bi prisutni konzervansi u kapima za oko trebali suzbiti rast patogena u ostatnoj otopini u spremniku lijeka, u nekoliko ispitivanja zabilježeno je da su keratitisi, konjuktivitisi pa čak i endoftalmitisi ipak bili uzrokovani navedenim bakterijama uzgojenim iz uzoraka primijenjenih kapi za oko. Odnosno, postoji rizik od infekcije oka posebice za pacijente s oštećenim epitelom rožnice (19). Gram-negativne bakterije su češće izolirane iz kontaminiranih oftalmičkih lijekova od gram-pozitivnih bakterija (15).

S ciljem objašnjavanja česte kontaminacije oftalmičkih pripravaka unatoč sadržaju konzervansa, na austrijskom odjelu oftalmologije provedeno je ispitivanje i usporedba postotka kontaminacije višedoznih oftalmičkih pripravaka u obliku kapi za oko koje primjenjuju liječnici i medicinske sestre na bolničkom odjelu oftalmologije, operacijskoj sali i ambulantnom odjelu, bez ograničenja za pojedinu bolest ili djelatnu tvar, te višedozne kapi za oko koje samostalno koriste pacijenti s glaukomom kod kuće. Bočice kapi za oko su sakupljane kroz 11 mjeseci, a bočice koje su pacijenti s glaukomom koristili samostalno morale su biti u upotrebi barem 4 tjedna. Obrađeno je preko 400 bočica kapi za oko. Uzorci s tih bočica uzeti su s vrška kapaljke, iz kapi otopine te ostatne tekućine u bočici, te su nacijepljeni na krvni agar. Nakon inkubacije pri 37 ^{o}C u trajanju od 48 sata izbrojane su jedinice koje formiraju kolonije (*Colony forming units* - CFU= broj jedinica koje formiraju kolonije), a reprezentativne kolonije su zatim precijepljene na novi krvni agar kako bi se dobile/izolirale čiste bakterijske kulture. Ti su uzorci analizirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom (eng. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s Time-of-flight (TOF) analizatorom) kako bi se analizom proteinskog profila odredila vrsta mikroba. Postotak kontaminacije je bio značajno veći u kapima za oko koje su pacijenti samostalno primjenjivali, zatim su slijedile kapi korištene na bolničkom odjelu, pa na ambulatnom odjelu i najmanje su bile kontaminirane kapi za oko korištene u operacijskim salama. Lijekovi za liječenje glaukoma su značajno više kontaminirani nego oftalmički antibiotici ili anestetici. U slučaju kapi za oko koje su samostalno primjenjivali pacijenti najviše je bio kontaminiran vrh kapaljke. U slučaju kapi za oko koje je pacijentima nanosilo medicinsko osoblje na odjelu, više su bile kontaminirane kapi

otopine i ostatna otopina lijeka u bočici. U tablici 5 nabrojani su izolirani mikroorganizmi opisanog ispitivanja. Predstavnici ljudske mikrobiote su bili dominantni, a zatim su sljedile bakterije iz okoliša i neki ljudski patogeni (19).

U samo 6 (1,5%) bočica koje su dolazile s ambulantnog odjela nađeni su patogeni sojevi bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Staphylococcus aureus*), a većina pronađenih mikroba pripadala je mikrobioti kože i okoliša. Takvi rezultati naglašavaju važnost higijenskog rukovanja kapima za oko. Postavlja se pitanje je li liječenje glaukoma jednodoznim oblicima lijekova možda poželjnije s ciljem smanjenja rizika od kontaminacije (19).

Tablica 5. Bakterijske vrste kao uzročnici kontaminacije (prilagođeno prema literaturnom navodu (19))

	Broj onečišćenih bočica kapi za oko				
Bakterije	Dom	Bolnički odjel	Ambulanta	Operacijska sala	Ukupno
Ljudski patogeni	6	1	1	0	8
Staphylococcus aureus	0	1	0	0	1
Pseudomonas aeruginosa	1	0	0	0	1
Pseudomonas **spp**.	2	0	0	0	2
Acinetobacter lwoffii	0	0	1	0	1
Stenotrophomonas maltophilia	2	0	0	0	2
Serratia marcescens	1	0	0	0	1
Pripadnici ljudske mikrobiote, fakultativni patogeni	27	12	5	3	47
Staphylococcus **spp**. *non aureus*	14	7	2	3	26
Micrococcus lutens	6	0	2	0	8
Corynebacterium **spp.**	5	1	0	0	6
Neisseria **spp**.	1	1	0	0	2
Rothia dentocariosa	1	0	0	0	1
Aerococcus viridans	0	0	1	0	1
Moraxella osloensis	0	1	0	0	1
Streptococcus **spp.**	0	1	0	0	1
Kocuria rosea	0	1	0	0	1
Bakterije i gljivice iz okoliša (ili mikrobiota iz okoliša)	8	15	2	3	28
Bacillus **spp**.	7	10	1	2	20
Arthrobacter **spp**.	1	0	1	0	2
Pantoea agglomerans	0	0	0	0	1
Streptomyces violaceoruber	0	1	0	0	1
Brevibacterium casei	0	1	0	0	1
Cellulosimicrobium cellulans	0	1	0	0	1
Aspergillus **spp**.	0	1	0	1	2

Provedeno je ispitivanje procjene učestalosti kontaminacije oftalmičkih otopina u ustanovama za njegu pacijenata (na primjer dom za starije osobe), gdje pacijenti samostalno primjenjuju kapi za oko. Od ukupno 123 ispitanih oftalmičkih otopina, koje je koristilo 47 pacijenata, 10 (8%) je bilo onečišćeno bakterijama: 4 (50%) od 8 protuupalnih pripravaka koji sadrže kortikosteroide, 2 (33%) od 6 kombiniranih pripravaka, 2 (6%) od 34 pripravaka za liječenje glaukoma i 2 (4%) od 57 otopina umjetnih suza. Od svih onečišćenih otopina samo se 30% vizualnim pregledom činilo kontaminiranim. Bakterija *Proteus mirabilis* je identificirana u 8 (80%) od 10 onečišćenih oftalmičkih otopina (tablica 6). Oftalmički pripravci midrijatika, miotika i antiinfektiva nisu bili onečišćeni (20).

Tablica 6. Učestalost kontaminacije oftalmičkih pripravaka u obliku otopine ovisno o vrsti otopine (prilagođeno prema literaturnom navodu (20))

Oftalmički pripravci (otopine) koje koriste pacijenti u ispitivanju	Broj ispitivanja	Broj onečišćenih oftalmičkih pripravaka (%)
Protuupalni pripravci koji sadrže kortikosteroide	8	4 (50)
Kombinacije protuupalnih i antiinfektivnih lijekova	6	2 (33)
Pripravci za liječenje glaukoma	34	2 (6)
Lubrikanti (umjetne suze)	57	2 (4)
Midrijatici	4	0
Miotici	11	0
Antiinfektivi	3	0
Ukupno	123	10 (8)

Liječenje bakterijskih infekcija oka provodi se prvenstveno topikalnim antibioticima, ponekad uz dodatak topikalnih kortikosterioda. Za kortikosteroide se smatra da u ranoj fazi liječenja mogu smanjiti obim oštećenja, neovaskularizaciju i stvaranje ožiljka koji se javljaju kao posljedica upalnih i imunih odgovora domaćina na bakterijsku infekciju. Također, smatra se da kortikosteroidi poboljšavaju adherenciju u terapiji bakterijskog keratitisa gdje je potrebno često primjenjivati antibiotske kapi za oko, na način da smanjuju bol i neugodu (18). Nedavno, pojavom monoterapije s četvrtom generacijom fluorokinolona dobiveni su obećavajući rezultati u liječenju bakterijskog keratitisa (22). Razvojem spekularne mikroskopije i metode lančane reakcije polimeraze (PCR) povećana je dijagnostička mogućnost infektivnog keratitisa, posebno u perzistentnim slučajevima. Povećanje obima umrežavanja kolagena u rožnici (kako bi se ponovno uspostavila zadovoljavajuća mehanička stabilnost) opcija je liječenja perzistentnih slučajeva (22).

GLJIVICE

Gljivične infekcije oka (oftalmičke mikoze) značajan su uzrok gubitka vida. Najčešći oblik je infekcija rožnice (keratitis) premda mogu biti zahvaćene i druge strukture oka. Gljivične infekcije rožnice predstavljaju izazov u liječenju zbog sličnosti sa simptomima (gnojne, ulcerativne lezije) drugih vrsta upale strome rožnice. Liječenje je također izazov zbog ograničene dostupnosti učinkovitih antifungalnih lijekova koji mogu prodrijeti u tkivo rožnice (23).

Gljivične infekcije rožnice često uzrokuju vrste iz rodova *Fusarium, Aspergillus, Curvularia* i *Candida* (tablica 7). Trauma rožnice je najvažniji predisponirajući čimbenik, no i drugi sistemski ili očni poremećaji kao i prethodna primjena kortikosteroida su važni čimbenici rizika. Dijagnoza se temelji na kulturi tkiva: izravna detekcija strukture gljiva putem mikroskopa iz strugotine rožnice ili biopsije. Za liječenje gljivičnih infekcija koriste se različiti antifungalni lijekovi ovisno o uzročniku. Primjerice, natamicin se daje samo topikalno, dok se amfotericin B, mikonazol, ketokonazol, itrakonazol i flukonazol mogu primijeniti različitim putevima primjene. Topikalni amfotericin B (0,1-0,3%) je često lijek izbora za infekcije uzrokovane kandidom i sličnim gljivicama, dok je topikalni natamicin (5%) lijek izbora za keratitis uzrokovan plijesnima (24).

Topikalni natamicin i amfotericin B su prvi izbor antifungalnih lijekova kada se sumnja na infekciju kvascima ili plijesnima. Vorikonazol i noviji načini primjene lijeka, kao što su intrastromalna i intrakameralna injekcija daju pozitivan klinički odgovor (22).

Tablica 7. Najčešće izolirane vrste gljivica koje uzrokuju infekcije rožnice (prilagođeno prema literaturnom navodu (23))

A. Hijalohifomicete – plijesni koje imaju neobojene hife
Fusarium (F. solani, F. oxysporum)
Aspergillus (A. fumigatus, A. flavus)
Scedosporium (S. apiospermum)
Acremonium (A. potronii, A. kiliense)
B. Feohifomicete – plijesni koje imaju tamno pigmentirane hife
Curvularia (C. lunata, C. geniculata, C. senegalensis)
Bipolaris (B. spicifera, B. hawaiiensis)
Exserohilum (E. rostratum, E. longirostrata)
Coelomycetes (Lasiodiplodia, Colletotrichum)
C. Kvasci
Candida (C. albicans)

Za liječenje gljivičnog keratitisa u Republici Hrvatskoj dostupne su slijedeće djelatne tvari: itrakonazol, vorikonazol (lijek izbora za liječenje teških gljivičnih infekcija uzrokovanih vrstama iz rodova *Scedosporium* i *Fusarium*), amfotericin B, kaspofungin, te izavukonazol (druga linija nakon amfotericina B ili itrakonazola) (25).

VIRUSI

Najčešći oblik virusne infekcije oka je virusni konjuktivitis, odnosno vrlo zarazna akutna infekcija spojnice obično uzrokovana adenovirusom. Simptomi su nadražaj, suzenje, fotofobija i iscjedak, a dijagnoza se postavlja klinički. Infekcija prolazi spontano, ali je ponekad u teškim slučajevima potrebna lokalna primjena kortikosteroida. Nakon inkubacije od oko 5 do 12 dana, u jednom oku dolazi do hiperemije spojnice, vodenastog iscjetka i nadražaja, koji se obično brzo širi i na drugo oko. Mnogi bolesnici su bili u dodiru s oboljelim od konjunktivitisa i/ili s nedavnom infekcijom gornjeg dišnog sustava. Konjunktivitis može pratiti običnu prehladu i druge sistemske virusne infekcije (osobito ospice, ali također i vodene kozice, rubeolu i mumps). Izolirani virusni konjunktivitis je obično uzrokovan adenovirusima, a ponekad i enterovirusima. Epidemijski keratokonjunktivitis obično uzrokuju adenovirusi serotipova Ad 5, 8, 11, 13, 19, i 37. Kod teškog adenovirusnog konjunktivitisa, bolesnici mogu imati naglašenu fotofobiju i osjećaj stranog tijela, te može doći do zamućenja vida. Sekundarna bakterijska infekcija je rijetka. Međutim, ako jedan od znakova odgovara bakterijskom konjunktivitisu (npr. gnojni iscjedak), brisevi oka se moraju mikroskopski pregledati i mikrobiološki odrediti uzročnika. Virusni konjunktivitis je samoograničavajući i traje u blagim slučajevima 1 tjedan, a u teškima i do 3 tjedna. Za simptomatsko liječenje dovoljni su hladni oblozi. Međutim, bolesnici s teškom fotofobijom ili oštećenim vidom mogu koristiti topikalne kortikosteroide (npr. 1%–tni prednizolon acetat svakih 6 do 8 sati). Prije toga je potrebno isključiti keratitis uzrokovan virusom herpesa simpleksa jer kortikosteroidi mogu izazvati njegovu egzacerbaciju (25). Ganciklovir je noviji antivirusni lijek s obećavajućim rezultatima u terapiji keratitisa uzrokovanog virusom herpesa simpleksa (22).

4.2. Kemijska klasifikacija oftalmičkih konzervansa

Prije 60 godina, mikrobiološko onečišćenje oftalmičkih pripravaka (kapi za oko) je bio značajan rizični faktor za razvoj bakterijskog keratitisa oka. Najčešće je kontaminaciju i oštećenja rožnice uzrokovala bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. Takva situacija dovela je do potrebe standardizirane, aseptičke proizvodnje kapi za oko, kojima se dodaje konzervans i koje se pune u sterilne višedozne spremnike, bilo plastične s čepom na navoj ili staklene opremljene pipetom za doziranje. Najčešće korišteni konzervansi za oftalmičke pripravke bili su benzalkonijev klorid i tiomersal. Benzalkonijev klorid uzrokuje toksične promjene na epitelu rožnice (27) koje su zabilježene već 1940-tih godina (2), a tiomersal ozbiljne reakcije preosjetljivosti (27). Posljedica korištenja kapi za oko koje su konzervirane takvim tvarima je rizik od razvoja poremećaja oka, s obzirom da se kapi za oko često primjenjuju, poput umjetnih suza kod sindroma suhog oka. S ciljem izbjegavanja oštećenja oka uslijed primjene takvih konzervansa, razvijeni su jednodozni spremnici kapi za oko bez konzervansa. Međutim, trošak proizvodnje oftalmičkih lijekova u jednodoznim spremnicima je puno veći u odnosu na njihovo pakiranje u višedozne spremnike (27).

Povijesno gledano, sredinom 1960-ih godina, tek nakon pojave teških ozljeda oka u Švedskoj, uzrokovanih kontaminacijom masti za oko bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*, uporaba konzervansa u oftalmičkim pripravcima je postala obvezna i zahtijevana od strane regulatornih tijela u Europi i SAD-u (15). Najvažniji oftalmički konzervansi se mogu klasificirati prema kemijskom sastavu. Tablica 8 daje pregled takvih konzervansa, njihove sinonime i uobičajenu koncentraciju, antimikrobni spektar i optimalni pH antimikrobne aktivnosti i kemijske stabilnosti.

Tablica 8. Pregled konzervansa oftalmičkih pripravaka (prilagođeno prema literaturnom navodu (15)).

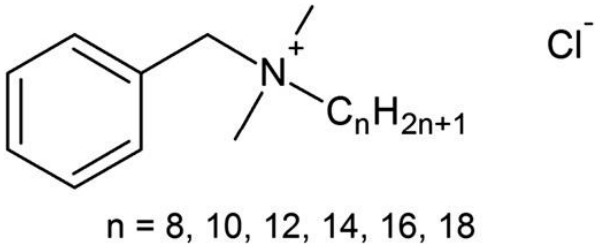
Kemijska klasifikacija	**Konzervans**	**Sinonim**	**Uobičajena koncentracija (%)**	**Antimikrobna aktivnost[a]**	**Optimalni pH[b]**
Kvarterni amonijevi spojevi	benzalkonijev klorid	alkil-dimetil-benzil amonijev klorid (BAK)	0,01 – 0,02	Y, F, G+, G-	4 - 10
	cetrimid	cetrimonij bromid[c]	0,005		7 - 9
	cetilpiridinij-klorid		0,025	G+, F	-
	benzododecinijev klorid		0,012	G+, F	-
	benzetonijev klorid		0,01 – 0,02	Y, F, G+, G-	4 - 10
Organski spojevi žive	tiomersal		0,001 – 0,02	Y, F, G+, G-	7 - 8[d]
Alkoholi	klorobutanol	aceton, kloroform	0,5	F, G+, G-	< 5,5
	benzilni alkohol	fenilmetanol	0,5	Y, F, G+,	< 5
	fenoksietanol		1	G-, *Pseudomonas*	< 6
	fenil etil alkohol	feniletanol	0,5	G+, G-	< 5
Karboksilne kiseline	sorbinska kiselina[e]	E200	0,2	F	4,5
Fenoli, Amidi	metil/propil paraben	E218/ E216	0,1	Y, G+	4 - 9
	klorheksidin diglukonat		0,005 -0,01	G+, G-	5 - 8
Ostali	EDTA	dinatrijev edetat	0,01 – 0,1	Y, F, G-	4 - 10

[a] Y (kvasci), F (gljivice), G+ (gram pozitivne bakterije), G- (gram negativne bakterije)
[b] Optimalni pH za antimikrobnu aktivnost i kemijsku stabilnost
[c] naziv „cetrimonij bromid“ (heksadeciltrimetilamonij bromid) je ranije bio korišten za „cetrimid“ (uglavnom trimetiltetradecilamonij bromid)
[d] Baktericidno djelovanje pri kiselom pH, a bakteriostatsko i fungistatsko djelovanje pri neutralnom i alkalnom pH
[e] Koristi se u kombinaciji s ostalim konzervansima

Uz konzervanse nabrojene u tablici 8, dodatna skupina su i noviji kozervansi kao na primjer Purite, sofZia, Polyquad (28). Tablica 9 daje pregled najčešće korištenih konzervansa, uključujući i novije konzervanse, te opisuje mehanizam djelovanja nabrojenih konzervansa kao i skupinu oftalmičkih lijekova koja najčešće sadrži pojedini konzervans.

Tablica 9. Najčešće korišteni oftalmički konzervansi (prilagođeno prema literaturnom navodu (29))

Kemijski sastav	Konzervans	Mehanizam djelovanja	Oftalmički lijekovi koji sadrže konzervans
kvarterni amonijev spoj	benzalkonijev klorid	površinski aktivna tvar	antiglaukomski lijekovi, protuupalni lijekovi, antibiotici i umjetne suze
polikvarterni amonijev spoj	polikvaternij (Polyquad)	površinski aktivna tvar	antiglaukomski lijekovi, otopine za njegu leća, umjetne suze
stabilizirani oksikloro kompleks	Purite	oksidans	antiglaukomski lijekovi, umjetne suze
organski živin spoj	tiomersal	taloženje proteina	protuupalni lijekovi, antibiotici
ionski puferirajući sustav	sofZia	oksidans	antiglaukomski lijekovi,
amid	klorheksidin	membranolitičko djelovanje	antibiotici
alkoholni spoj	klorobutanol	povećana propusnost za lipide	midrijatici, antibiotici, protuupalni lijekovi



Slika 3. Strukturna formula benzalkonijevog klorida (prilagođeno prema literaturnom navodu (2))

Benzalkonijev klorid (BAK) je jedan od prvih i najčešće korištenih konzervansa (slika 3). Izvorno je razvijen kao germicid 1910-tih godina, a prvi je put korišten u oftalmičkim pripravcima 1940-tih godina kao konzervans za otopine za tvrde leće. Od tada se koristi za gotovo sve oftalmičke otopine, od umjetnih suza do pripravaka za terapiju glaukoma (28). Citotoksičnost na površini oka je zabilježena tek 1970-tih godina. Od tada se na različite načine BAK pokušava zamijeniti, uključujući druge površinski aktivne tvari kao polikvaternij-1 (Polyquad) kao i konzervanse novije generacije poput stabiliziranog oksikloro-kompleksa (Purite) i ionskog puferirajućeg sustava (sofZia). Iako su

takvi suvremeni konzervansi značajno manje toksični od BAK-a, također pokazuju određene nuspojave (28).

Učinci BAK-a na rožnicu i suzni film su dobro dokumentirani, a najčešće nuspojave uključuju crvenilo spojnice, smanjenu proizvodnju suza, nestabilnost suznog filma i površinski točkasti keratitis (bolovi u oku i zamućeni vid) (28).

Učinci BAK-a na spojnicu oka su povezani s upalnim reakcijama, uključujući simptome poput kongestije (prekomjernu prokrvljenost), suzenja oka, osjetljivost na svjetlo i osjećaj peckanja. Stanice sisavaca ne mogu neutralizirati površinski aktivne tvari kao što je BAK zbog čega djeluje kao iritans ili čak kao hapten koji inducira alergijsku reakciju u oku. Mnogi su tumorski markeri upalne reakcije povezani s primjenom BAK-a na stanice spojnice; uključujući interleukine 1, 10 i 12, tumor nekrotizirajući faktor alfa (TNF-α), pa čak i C-reaktivni protein (28).

I u današnje je vrijeme BAK najčešće korišteni konzervans u oftalmičkim pripravcima, a koristi se u koncentracijskom rasponu od 0,004% do 0,025% (*m*/*V*) u kapima za oko. BAK je kationska površinski aktivna tvar koja sadrži dušik, a svrstava se u kvarterne amonijeve spojeve. Kvarterni amonijevi spojevi su dobro topljivi u vodi i površinski aktivni, a razlikuju se po sposobnosti otapanja bakterijske stijenke i membrane te uništavanju polupropusnog citoplazmatskog sloja (2). BAK je smjesa alkildimetilbenzilamonijevih klorida, različite duljine alkilnog lanca, opće formule $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$, gdje R predstavlja alkilni radikal između C8 do C18. U komercijalnim pripravcima, koriste se alkilni derivati duljine uglikovodičnog lanca od C12, C14 i C16. BAK-C12 naziva se benzododecinij klorid, BAK-C14 miristalkonijev klorid i BAK-C16 cetalkonijev klorid (2). Pri niskim koncentracijama, BAK je u vodenim otopinama pozitivno nabijen s amfipatskom konformacijom. BAK kationi stvaraju micele pri koncentracijama BAK iznad kritičnih micelizacijskih koncentracija (CMC). Micele su najčešće sferični agregati koje karakterizira hidrofobna jezgra i hidrofilni omotač. CMC BAK-a ovisi o sastavu alkilnih lanaca duljine C12, C14 i C16. CMC je zabilježena pri koncentraciji BAK-a od 0,02%. Učinak BAK micela na stanice površine oka nije u potpunosti ispitan. Iako je opažen manji toksičan učinak od očekivanog na staničnim linijama pri visokim BAK koncentracijama, vjerojatno zbog stvaranja micela, visoke BAK koncentracije *in vivo* uzrokuju veliko oštećenje stanica površine oka i promjene na tkivima oka. Biološka aktivnost BAK-a

osniva se na interakciji s proteinima, lipidima i G-proteinima u biološkim membranama. Kao mikrobicidna tvar, vrlo je toksičan, a toksični učinak je ovisan o dozi i vremenu izloženosti (2). Baktericidna aktivnost BAK-a je brza i najveća pri 37 °C u alkalnoj sredini. Spektar djelovanja je uglavnom usmjeren na Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus*) čak i pri vrlo niskim koncentracijama. Djelovanje protiv Gram-negativnih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*) se povećava kada je u kombinaciji s 0,1%-tnim dinatrijevim etilendiamintetraacetatom (EDTA). Općenito, kvarterni amonijevi spojevi su također izvrsni fungicidi, a posebno su aktivni protiv vrsta *C. albicans* i *Aspergillus fumigatus* (2).

Ispitana su i svojstva pet različitih konzervansa: kombinacija BAK + EDTA , paraben, klorbutanol, srebro klorid kompleks, i Purite – stabilizirani oksikloro kompleks. Kombinacija BAK + EDTA je jedina zadovoljila farmakopejske zahtjeve za djelotvornost konzervansa oftalmičkih proizvoda za sve ispitane mikroorganizame. Osim toga, jedino je BAK od testiranih konzervansa inhibirao bakteriju *S. aureus*. BAK učinkovito uništava stanične membrane mikroorganizama i naizgled ima dobar sigurnosni profil, iako je gotovo nemoguće da kemijska tvar može razlikovati membrane patogena od membrana normalnih stanica oka (30).

Jedan od glavnih argumenata za korištenje kvarternih amonijevih spojeva je učinak pojačavanja apsorpcije lijeka u prednju očnu sobicu, kroz remećenje hidrofobne barijere epitela rožnice. Takvo svojstvo BAK-a bi moglo rezultirati većom koncentracijom lijeka i boljom stimulacijom ili inhibicijom ciljnih receptora, odnosno mogla bi se očekivati veća učinkovitost lijeka (2).
U dva klinička ispitivanja uspoređivani su farmakokinetski i farmakodinamski profili konzerviranog farmaceutskog oblika tafluprosta, analoga prostaglandina (lipofilne djelatne tvari), i farmaceutskog oblika bez konzervansa. Nisu pronađene statistički značajne razlike u farmakokinetičkim parametrima niti u sistemskoj bioraspoloživosti; također nije pronađena značajna razlika u snižavanju intraokularnog tlaka između konzerviranih i nekonzerviranih farmaceutskih oblika (ukupno sniženje tlaka od ± 0,46 mmHg). Uspoređivani su i farmacutski oblici travoprosta konzervirani s BAK-om i oni konzervirani sa Sofzia-om, te nisu pronađene razlike u kontroli intraokularnog tlaka (2).

Mnogo je dostupnih literaturnih podataka koji ukazuju da BAK uzrokuje oštećenje površine oka. Najčešće se *in vivo* ispitivanja provode na kunićima, stoga je zbog postojećih razlika između kunića i ljudi, potrebna precizna ekstrapolacija rezultata. Ispitana je toksičnost oftalmičkih otopina koje sadrže BAK u koncentraciji od 0,005% do 0,01% (*m*/*V*) te se primjenjuju na oko kunića i majmuna dva puta dnevno kroz 52 tjedna (364 dana). Nisu zabilježene niti iritacije oka niti oštećenja rožnice (31).

Klorobutanol je alkohol koji ima široki spektar antimikrobne aktivnosti. Također je i površinski aktivna tvar koja djeluje na organizaciju strukture lipida stanične membrane, odnosno povećava propusnost u stanicu, što dovodi do lize stanica. Ometa barijerna i transportna svojstva epitela rožnice i sprječava izmjenu atmosferskog kisika (16).

Parabeni su zajednički naziv za metilparahidroksi-benzoat (metilparaben, MP) i propilparahidroksi-benzoat (propilparaben, PP) koji se koriste kao konzervansi u oftalmičkim pripravcima u koncentracijama od 0,015% do 0,2% (*m*/*V*) za MP i 0,005% do 0,01% (*m*/*V*) za PP (32).
Metilparaben je posebno učinkovit protiv plijesni i kvasaca. Ako se koristi u koncentracijama koje su učinkovite protiv mikroorganizama može izazvati iritaciju oka (16). Parabeni zadovoljavaju većinu zahtjeva za idealan konzervans, kao što je širok raspon antimikrobne aktivnosti, sigurnost (niska toksičnost) i stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti pripravka. Međutim sve je više dokaza o rezistenciji mikroorganizama na parabene, a nekoliko je slučajeva gdje su parabeni bili razgrađeni od strane dvije vrste Gram-negativnih bakterija: *Pseudomonas beteli* i *Burkholderia latens* (32).

Timerosal je organski spoj koji sadrži živu, ima baktericidno i fungicidno djelovanje, no više se ne koristi u oftalmičkim pripravcima zbog opasnosti od oštećenja živčanog sustava (16).

Dinatrijev etilendiamintetraacetat (EDTA) i izotonični fosfatni pufer nisu konzervansi no dodaju se većini oftalmičkih otopina kao puferska sredstva. Iako se stabilizatori poput pufera smatraju općenito netoksičnima, potencijal za toksičnost ipak postoji. Zapravo, bilo kakva kemijska tvar koja se dodaje kapima za oko, ima relativan toksični potencijal. Toksičnost farmaceutskih sirovina može

dovesti do smanjenja oštrine vida i/ili mogu uzrokovati nelagodu kod pacijenta što pak dovodi do smanjene adherencije (16). Za EDTA je zabilježeno da pojačava transkornealnu permeaciju djelatne tvari, vjerojatno kao posljedica ultrastrukturne promjene u epitelu rožnice (16). EDTA kao kelator kalcijevih iona slabi čvrste veze između epitelnih stanica i tako povećava permeabilnost rožnice za različite djelatne tvari (15).

4.3. Pregled konzervansa u oftalmičkim pripravcima

Tablicom 10 pregledno su prikazani oftalmički pripravci odobreni u Republici Hrvatskoj s navedenom vrstom i koncentracijom korištenog konzervansa. Podaci su preuzeti iz javno dostupne baze lijekova na mrežnoj stranici HALMEDA. Najčešće korišteni konzervans je benzalkonijev klorid. Po učestalosti ostali odobreni konzervansi su polikvaternij-1 (POLYQUAD), parabeni, klorobutanol, te benzododecinijev klorid i cetalkonijev klorid.

Postupak davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet u Republici Hrvatskoj (33)

U Republici Hrvatskoj u prometu može biti samo onaj lijek koji ima odobrenje za stavljanje u promet dano od Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) ili Europske komisije (EK).

HALMED daje odobrenje za stavljanje u promet za lijekove odobrene kroz nacionalni postupak i zajedničke europske postupke odobravanja lijekova: postupak međusobnog priznavanja (engl. *Mutual Recognition Procedure*; MRP) i decentralizirani postupak (engl. *Decentralized Procedure*; DCP), dok EK daje odobrenja za lijekove u centraliziranom postupku.

Odobrenje za stavljanje u promet može se dati samo za lijek za koji je temeljem stručno znanstvene ocjene dokumentacije o lijeku utvrđeno da je lijek odgovarajuće farmaceutske kakvoće te da je korist njegove primjene veća od rizika.

Stručno znanstvena ocjena provodi se prema unaprijed definiranim kriterijima te utvrđenim normama i standardima koje nalazimo u hrvatskim i europskim propisima i smjernicama vezanim za lijekove te prema najnovijim znanstvenim spoznajama.

Podnošenje zahtjeva za pokretanje postupka u Republici Hrvatskoj prema MRP/DCP ili nacionalnom postupku (33):

- Način podnošenja zahtjeva za davanje odobrenja u Republici Hrvatskoj propisan je Zakonom o lijekovima (34) i Pravilnikom o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (35).
- Zahtjev za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet HALMED-u može podnijeti fizička ili pravna osoba sa sjedištem u Europskoj uniji (u nastavku podnositelj zahtjeva).

Dokumentacija o lijeku (33):

Uz zahtjev podnositelj zahtjeva obvezan je priložiti dokumentaciju o lijeku koja se dostavlja u obliku Zajedničkog tehničkog dokumenta (u nastavku CTD prema engl. *Common Tehnical Document*).

Osnovni dijelovi CTD-a jesu:

- Modul 1: administrativni podaci i informacije o lijeku,
- Modul 2: sažeci dokumentacije,
- Modul 3: kakvoća,
- Modul 4: izvješća o nekliničkim ispitivanjima,
- Modul 5: izvješća o kliničkim ispitivanjima.

Dokumentacija o lijeku može biti u elektroničkom (eCTD ili Nees oblik) ili papirnatom obliku.

Kapi za oko koje nisu lijekovi (na primjer umjetne suze) već medicinski proizvod (prema članku 3. Zakona o medicinskim proizvodima, Narodne novine, br. 76/13.) upisuju se u očevidnik medicinskih proizvoda.

HALMED vodi (33):

- očevidnik proizvođača medicinskih proizvoda
- očevidnik medicinskih proizvoda klase rizika I
- evidenciju o medicinskim proizvodima klase rizika IIa, IIb i III.

Postupak, način upisa i dokumentacija za upis proizvođača u očevidnik proizvođača, postupak, način upisa i dokumentacija za upis medicinskog proizvoda klase rizika I u očevidnik medicinskih proizvoda te sadržaj i način podnošenja obavijesti o stavljanju medicinskog proizvoda u promet propisani su Pravilnikom o bitnim zahtjevima, razvrstavanju, upisu proizvođača u očevidnik proizvođača, upisu medicinskih proizvoda u očevidnik medicinskih proizvoda te ocjenjivanju sukladnosti medicinskih proizvoda (Narodne novine, br. 84/13.) (33).

U očevidnik medicinskih proizvoda upisuju se medicinski proizvodi klase rizika I. Medicinski proizvodi izrađeni po narudžbi za određenog korisnika se ne upisuju u očevidnik medicinskih proizvoda.

Medicinski proizvod svoje glavno namjeravano djelovanje u/ili na ljudskom tijelu ne postiže farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim učincima, iako njegovo djelovanje može biti potpomognuto takvim učincima (33).

Medicinski proizvod namijenjen je:

- dijagnosticiranju, sprečavanju, praćenju, liječenju i ublažavanju bolesti
- dijagnosticiranju, praćenju, liječenju, kontroli, ublažavanju ili otklanjanju tjelesnog oštećenja ili nedostatka
- ispitivanju, otklanjanju ili nadomještanju ili preinaci anatomskih ili fizioloških funkcija organizma
- kontroli začeća.

Prema dostupnim podacima medicinskih proizvoda, dostupnoj na internetskim stranicama HALMED-a može se vidjeti da su kapi za oko, umjetne suze klasificirane kao klasa IIa (primjerice, Systane® ultra kapi za ovlaživanje oka) i kao klasa IIb (primjerice, Bepanthol kapi za oko).

Tablica 10. Trenutno odobreni oftalmički lijekovi u RH s pripadajućim konzervansima (prilagođeno prema literaturnom navodu (25))

Naziv lijeka (zaštićeno ime)	Djelatna tvar	Konzervans	Koncentracija konzervansa	Ostale pomoćne tvari
Alleofta 20 mg/ml kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku **	Na-kromoglikat	X	X	natrijev klorid, pročišćena voda
Allergodil 0,5 mg/ml kapi za oko, otopina	azelastin	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	dinatrijev edetat, hipromeloza, sorbitol, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Alomide 1 mg/ml kapi za oko, otopina	lodoksamid	benzalkonijev klorid	0,07 mg/ml	manitol, dinatrijev edetat, hipromeloza, natrijev citrat, citratna kiselina hidrat, tiloksapol, natrijev hidroksid i/ili kloridna kiselina, pročišćena voda
Alphagan 0,2% *m*/*V* (2 mg/ml) kapi za oko, otopina	brimonidin	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	poli(vinil)alkohol, natrijev klorid, natrijev citrat, citratna kiselina, pročišćena voda, kloridna kiselina ili natrijev hidroksid (za podešavanje pH)
Azarga* (kapi za oko, suspenzija)	brinzolamid + timolol	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	manitol, karbopol, tiloksapol, dinatrijev edetat, natrijev klorid, kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Azopt* (kapi za oko, suspenzija)	brinzolamid	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	manitol, karbopol, tiloksapol, dinatrijev edetat, natrijev klorid, kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Azyter 15 mg/g kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku	azitromicin	X	X	trigliceridi srednje duljine lanca

Betoptic 5 mg/ml kapi za oko, otopina	betaksolol	benzalkonijev klorid	0,10 mg/ml	dinatrijev edetat, natrijev klorid i pročišćena voda, kloridna kiselina ili natrijev hidroksid
Bimanox 2 mg/ml kapi za oko, otopina	brimonidin	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	natrijev klorid, poli(vinilni alkohol), natrijev citrat, citratna kiselina hidrat, natrijev hidroksid, kloridna kiselina, voda pročišćena
Bondulc 40 mikrograma/ml kapi za oko, otopina **	travoprost	benzalkonijev klorid	0,150 mg/ml	makrogol-glicerolhidroksi-stearat 40, trometamol, dinatrijev edetat, boratna kiselina , manitol, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Brimot 2 mg/ml kapi za oko, otopina	brimonidin	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	poli(vinilni alkohol), natrijev klorid, natrijev citrat, citratna kiselina hidrat, kloridna kiselina, natrijev hidroksid, pročišćena voda
Combigan 2 mg/ml + 5 mg/ml kapi za oko, otopina	brimonidin + timolol	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	natrijev dihidrogenfosfat heptahidrat, natrijev hidrogenfosfat hidrat, pročišćena voda
Cosopt 20 mg/ml + 5 mg/ml, kapi za oko, otopina	dorzolamid + timolol	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	hidroksietilceluloza, manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
COSOPT PF 20 mg/ml + 5 mg/ml kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku**	dorzolamid + timolol	X	X	hidroksietilceluloza, manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Dexafluid 1,315 mg/ml kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku **	deksametazon	X	X	natrijev klorid, bezvodni natrijev hidrogenfosfat, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, dinatrijev edetat, voda za injekcije

Dexagel 0,985 mg/g gel za oko **	deksametazon	benzododecinijev klorid (C-12 homolog benzalkonijevog klorida)	Podatak nije javno dostupan	karbomer, sorbitol, dinatrijev edetat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Dorzol 20 mg/ml kapi za oko, otopina	dorzolamid	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, hidroksietilceluloza, pročišćena voda
DuoTrav* (kapi za oko, otopina)	travoprost + timolol	polikvaternij-1 (POLYQUAD)	10 µg/ml	manitol, propilenglikol, polioksietilen hidrogenirano ricinusovo ulje, boratna kiselina, natrijev klorid, natrijev hidroksid ili/i kloridna kiselina, pročišćena voda
Efflumidex Liquifilm 1 mg/ml kapi za oči, suspenzija	fluorometolon *Trajni prekid opskrbe*	benzalkonijev klorid	0,0046% *m/V*	dinatrijev edetat, polivinilni alkohol, natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat, heptahidrat, natrijev dihidrogenfosfat, hidrat, polisorbat 80, natrijev hidroksid, pročišćena voda
Emadine* (kapi za oko, otopina)	emedastin	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	trometamol (Tris; emulgator), natrijev klorid, hipromeloza, kloridna kiselina/ natrijev hidroksid, pročišćena voda
Ganfort* (kapi za oko, otopina)	bimatoprost + timolol	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, citratna kiselina hidrat, kloridna kiselina ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Glaumax 20 mg/ml + 5 mg/ml kapi za oko, otopina	dorzolamid + timolol	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, hidroksietilceluloza, pročišćena voda
Ikervis*	ciklosporin	cetalkonijev	0,05 mg/ml	srednjelančani trigliceridi, glicerol, tiloksapol,

(kapi za oko, emulzija)		klorid		poloksamer 188, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Isopto Tears 5 mg/ml kapi za oko, otopina	hipromeloza	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	natrijev citrat, natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, natrijev dihidrogenfosfat, hidrat, natrijev klorid, pročišćena voda
Izba* (kapi za oko, otopina)	travoprost	polikvaternij-1	Podatak nije javno dostupan	polioksietilen hidrogenirano ricinusovo ulje 40 (HCO-40), boratna kiselina, manitol, natrijev klorid, propilenglikol, natrijev hidroksid i/ili kloridna kiselina, pročišćena voda
Lapovis 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,2 mg/ml	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, natrijev hidroksid i/ili fosfatna kiselina, pročišćena voda
Latanoprost Cipla 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,02 % *m*/*V* (0,21 mg/ml)	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat hidrat, bezvodni natrijev hidrogenfosfat, voda za injekcije
Latanox 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,20 mg/ml	natrijev dihidrogenfosfat hidrat, natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, natrijev klorid, pročišćena voda
Latapres 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,2 mg/ml	natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, natrijev klorid, pročišćena voda
Lumigan* (kapi za oko, otopina)	bimatoprost	benzalkonijev klorid	0,2 mg/ml	natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat heptahidrat, citratna kiselina hidrat, kloridna kiselina ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Luxfen 2 mg/ml kapi za oko, otopina	brimonidin	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	poli(vinilni alkohol), natrijev klorid, natrijev citrat, citratna kiselina hidrat, pročišćena voda, natrijev hidroksid i kloridna kiselina

Maxidex 1 mg/g mast za oko	deksametazon	metilparahidroksi-benzoat (E218) (metil-paraben), propilparahidroksi-benzoat (E316)	0,5 mg/g MP, 0,1 mg/g PP	tekući lanolin, bezvodni i bijeli vazelin
Maxidex 1 mg/ml kapi za oko, suspenzija	deksametazon	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, polisorbat 80, dinatrijev edetat, natrijev klorid, hipromeloza, citratna kiselina, hidrat i/ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Maxitrol kapi za oko, suspenzija	deksametazon + neomicin + polimiksin B	benzalkonijev klorid	0,04 mg/ml	natrijev klorid, polisorbat 20, hipromeloza, koncentrirana kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Maxitrol mast za oko	deksametazon + neomicin + polimiksin B	metilparahidroksi-benzoat (E218) propilparahidroksi-benzoat (E216)	0,5 mg/g MP, 0,1 mg/g PP	tekući lanolin, bezvodni vazelin, bijeli
Moksacin 5 mg/ml kapi za oko, otopina	moksifloksacin	X	X	natrijev klorid, boratna kiselina, natrijev hidroksid, pročišćena voda
Mydrane 0,2 mg/ml + 3,1 mg/ml + 10 mg/ml otopina za injekciju	tropikamid + fenilefrin + lidokain	X	X	natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, dinatrijev edetat, voda za injekcije
NACLOF 1 mg/ml kapi za oko, otopina	diklofenak	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	dinatrijev edetat, hidroskipropil-ciklodekstrin, kloridna kiselina razrijeđena, propilenglikol, trometamol, tiloksapol, voda za injekcije
Nevanac*	nepafenak	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	manitol, karbomer, natrijev klorid, tiloksapol, dinatrijev edetat, natrijev hidroksid i/ili kloridna kiselina,

(kapi za oko, suspenzija)				pročišćena voda
Oftidor 20 mg/ml kapi za oko, otopina	dorzolamid	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	hidroksietilceluloza, manitol, citratna kiselina hidrat, natrijev hidroksid, pročišćena voda
Oftidorix 20 mg/ml + 5 mg/ml, kapi za oko, otopina	dorzolamid + timolol	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	manitol, hidroksietilceluloza, natrijev citrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Omidria* (koncentrat za otopinu za irigat za oko)	fenilefrin + ketorolaktrome-tamol	X	X	citratna kiselina, hidrat, natrijev citrat dihidrat, natrijev hidroksid, kloridna kiselina, voda za injekcije
Opatanol* (kapi za oko, otopina)	olopatadin	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	natrijev klorid, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, kloridna kiselina, natrijev hidroksid, pročišćena voda
Ozurdex* (intravitrealni implantat u aplikatoru)	deksametazon	X	X	50:50 poli(D,L-laktid-ko-glikolid) s terminalnom esterskom skupinom
Proculin 0,3 mg/ml kapi za oko, otopina	nafazolin	benzalkonijev klorid	0,06 mg/ml	boratna kiselina, natrijev tetraborat, dinatrijev edetat, natrijev klorid, voda za injekcije
Saflutan 15 mikrograma/ml kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku	tafluprost	X	X	glicerol, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, dinatrij edetat, polisorbat 80 kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, voda za injekcije
Simbrinza* (kapi za oko, suspenzija)	brinzolamid + brimonidin	benzalkonijev klorid	0,03 mg/ml	propilenglikol, karbomer 974P, boratna kiselina, manitol, natrijev klorid, tiloksapol, kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid (za podešavanje pH vrijednosti), pročišćena voda

Taptiqom 15 mikrograma/ml + 5 mg/ml kapi za oko, otopina u jednodoznom spremniku	tafluprost + timolol	X	X	glicerol, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, dinatrijev edetat, polisorbat 80, kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, voda za injekcije
Tears naturale kapi za oko, otopina	dekstran + hipromeloza	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	dinatrijev edetat, natrijev klorid, kalijev klorid, kloridna kiselina i/ili natrijev hidroksid, pročišćena voda
Timalen 2,5 mg/ml kapi za oko, otopina	timolol	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, pročišćena voda
Timalen 5 mg/ml kapi za oko, otopina	timolol	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, pročišćena voda
Timlatan 50 mikrograma/ml + 5 mg/ml kapi za oko, otopina	latanoprost + timolol	benzalkonijev klorid	0,2 mg/ml	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, natrijev hidroksid, kloridna kiselina, pročišćena voda
Tobradex 3 mg + 1 mg/g mast za oko	tobramicin + deksametazon	klorobutanol, bezvodni	Podatak nije javno dostupan	parafin, tekući i vazelin, bijeli
Tobradex 3 mg + 1 mg/ml kapi za oko, suspenzija	tobramicin + deksametazon	bezalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	tiloksapol, dinatrijev edetat, natrijev klorid, hidroksietilceluloza, natrijev sulfat, bezvodni, sulfatna kiselina i/ili natrijev hidroksid, voda, pročišćena
Tobrex 3 mg/g mast za oko	tobramicin	klorobutanol bezvodni	Podatak nije javno dostupan	parafin, tekući, vazelin, bijeli
Tobrex 3 mg/ml kapi za oko, otopina	tobramicin	benzalkonijev klorid	0,1 mg/ml	boratna kiselina, natrijev sulfat, bezvodni, natrijev klorid, tiloksapol, sulfatna kiselina ili natrijev hidroksid,

				pročišćena voda
Travatan* (kapi za oko, otopina)	travoprost	polikvaternij-1 (POLYQUAD)	10 µg/ml	propilenglikola, polioksietilen hidrogeniranog ricinusovog ulja 40 (HCO-40), boratna kiselina, manitol, natrijev klorid propilenglikol, natrijev hidroksid i/ili kloridna kiselina, pročišćena voda
Travoprost Pliva 40 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	travoprost	polikvaternij-1 (POLYQUAD)	10 µg/ml	makrogolglicerolhidroksistearat 40, propilenglikol, natrijev klorid, boratna kiselina, manitol, natrijev hidroksid, kloridna kiselina, pročišćena voda
Trusopt 20 mg/ml kapi za oko, otopina	dorzolamid	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	hidroksietilceluloza, manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Ulom 20 mg/ml kapi za oko, otopina	dorzolamid	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	hidroksietilceluloza, manitol, natrijev citrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Ulom Plus 20 mg/ml + 5 mg/ml, kapi za oko, otopina	dorzolamid + timolol	benzalkonijev klorid	0,075 mg/ml	hidroksietilceluloza, manitol, natrijev citrat dihidrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Uniflox 3 mg/ml kapi za oko, otopina**	ofloksacin	benzalkonijev klorid	0,05 mg/ml	natrijev dihidrogenofosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, voda za injekcije
Unilat 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,10 mg/ml	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat hidrat (E339a), natrijev hidrogenfosfat, bezvodni (E339b), kloridna kiselina, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Visine Classic 0,5 mg/ml kapi za oko, otopina	tetrizolin	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	natrijev klorid, boratna kiselina, natrijev borat, dinatrijev edetat i voda, pročišćena
Visobar 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,20 mg/ml	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, pročišćena voda

Vizol 0,5 mg/ml kapi za oko, otopina	nafazolin	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	boratna kiselina, natrijev tetraborat, dinatrijev edetat, pročišćena voda
Vizioblok 5 mg/ml kapi za oko, otopina**	timolol	X	X	natrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidroksid, voda za injekcije
Xalacom 50 mikrograma/ml + 5 mg/ml, kapi za oko, otopina	latanoprost + timolol	benzalkonijev klorid	Podatak nije javno dostupan	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat hidrat, natrijev hidrogenfosfat, bezvodni, kloridna kiselina natrijev hidroksid, voda za injekcije
Xalatan 50 mikrograma/ml kapi za oko, otopina	latanoprost	benzalkonijev klorid	0,02% *m*/*V*	natrijev klorid, natrijev dihidrogenfosfat hidrat, dinatrijev fosfat bezvodni, voda za injekcije
Yellox* (kapi za oko, otopina)	bromfenak	benzalkonijev klorid	50 µg/ml	boratna kiselina, natrijev tetraborat, natrijev sulfit, bezvodni (E221), tiloksapol, povidon (K30), dinatrijev edetat, natrijev hidroksid, voda za injekcije

Napomena:

* Lijek je odobren centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje u promet lijeka.

** Lijek nije stavljen u promet u Republici Hrvatskoj.

Tablica 11 daje pregled vrste i koncentracije konzervansa u pojedinim topikalnim oftalmičkim lijekovima za liječenje glaukoma odobrenima u SAD, te pokazuje da je BAK najčešće korišteni konzervans.

Tablica 11. Topikalni oftalmički lijekovi za liječenje glaukoma (prilagođeno prema literaturnom navodu (36))

ATK	Generički naziv /Zaštićeni naziv lijeka	Proizvođač	Konzervans	Koncentracija (%, *m*/*V*)
Beta-blokatori	Timolol maleat / Timoptic	Merck	BAK[a]	0,01
	Timolol maleat / Timoptic-XE	Merck	BDD[b]	0,012
	Kartelol / Ocupress	CIBA	BAK	0,005
	Levobunolol / Betagan	Allergan	BAK	0,005
	Betaksolol / Betoptic-S	Alcon	BAK	0,01
Inhibitori karboanhidraze	Brinzolamid / Azopt	Alcon	BAK	0,01
	Dorzolamid / Trusopt	Merck	BAK	0,008
Analozi prostaglandina	Latanoprost /Xalatan	Pfizer	BAK	0,02
	Travoprost 0,004% / Travatan	Alcon	BAK	0,015
	Travoprost 0,004% / Travatan Z	Alcon	sofZia	
	Tafluprost 0,0015% / Saflutan[c]	Merck	/	
	Bimatoprost / Lumigan	Allergan	BAK	0,005
Simpatomimetici	Brimonidin tartarat / Alphagan	Allergan	BAK	0,005
	Brimonidin / Alphagan P	Allergan	Purite	
	Epinefrin hidroklorid / Epifrin	Allergan		
Kolinergički agonisti	Pilokaprin hidroklorid / Isopto Carpine	Alcon	BAK	0,01
	Pilokaprin hidroklorid /Pilogel	Alcon		
Inhibitori kolinesteraze	Fiziostigmin / Eserine sulphate	Alcon		
Kombinirani pripravci	Dorzolamid + timolol maleat /Cosopt	Merck	BAK	0,008
	Travoprost + timolol / DuoTrav[c]	Alcon	BAK	0,015
	Bimatoprost + timolol / Ganfort	Allergan	BAK	0,005
	Latanoprost + timolol / Xalacom	Pfizer	BAK	0,02
	Brimonidin + timolol / Combigan	Allergan	BAK	0,005

[a] BAK – benzalkonijev klorid; [b] BDD – benzododecinijev bromid; [c] nije na tržištu SAD-a

4.4. Farmakopejska ispitivanja antimikrobne učinkovitosti konzervansa u oftalmičkim pripravcima

Sterilnost proizvoda mora se osigurati primjenom validiranog proizvodnog postupka. Uvijek kada je moguće, odabire se postupak kojim se proizvod sterilizira u svom konačnom spremniku (završna sterilizacija). Ako završna filtracija nije moguća, koristi se filtriranje kroz bakteriološki filtar ili aseptički postupak izrade, čiji je cilj održati sterilnost proizvoda sastavljenog iz više dijelova. U svakom slučaju, spremnik i zatvarač moraju osigurati sterilnost proizvoda tijekom njegovog roka valjanosti. Neki djelatni sastojci i proizvodi koji se ne mogu završno sterilizirati mogu se filtrirati kroz takvu vrstu filtra koji se pokazao zadovoljavajućim u ispitivanju mikrobiološkog izazova (engl. *challenge test*), s odgovarajućim mikroorganizmom za ispitivanje. Otopine se propuštaju kroz bakteriološke filtre s nazivnom veličinom pora od 0,22 μm ili manjom ili neke druge jednakovrijedne vrste bakterioloških filtara. Odgovarajuće mjere se provode u svrhu izbjegavanja gubitaka otopljenih tvari adsorpcijom na filtar te izbjegavanja otpuštanja onečišćenja iz filtra (1).

Obje farmakopeje, Američka farmakopeja (USP) i Europska farmakopeja (Ph.Eur.), propisuju ispitivanje djelotvornosti konzervansa protiv različitih mikrobnih vrsta iz četiri glavne klase patogenih mikroorganizama za oko. To su Gram-pozitivni koki (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativni bacili (*Pseudomonas aeruginosa*), kvasci (*Candida albicans*) i plijesni (*Aspergillus niger* tj. u novije vrijeme *A. brasiliensis*). Međutim, farmakopejski zahtjevi ne isključuju kontaminaciju kapi za oko drugim mikroorganizmima (15).

Ispitivanje antimikrobne učinkovitosti konzervansa prema Europskoj farmakopeji

Na antimikrobnu učinkovitost konzervansa može utjecati i djelatna tvar oftalmičkog pripravka kao i sam spremnik u koji je pripravak pakiran. Antimikrobna učinkovitost konzervansa u spremniku se istražuje tijekom razdoblja roka valjanosti kako bi se osigurala antimikrobna učinkovitost konzervansa tijekom perioda skladištenja (1).

Antimikrobna učinkovitost konzervansa može se ispitati testom koji nije namijenjen za rutinsku kontrolu. Ispitivanje se sastoji od testiranja farmaceutskog oblika lijeka, kad je god moguće u završnom spremniku, s propisanim inokulumom prikladnih mikroorganizama. Takav se umjetno kontaminirani farmaceutski oblik lijeka čuva pri određenoj temperaturi i uzimaju se uzorci iz spremnika u točno propisanim vremenskim intervalima. Antimikrobna učinkovitost konzervansa u formulaciji je zadovoljavajuća ako, sukladno uvjetima ispitivanja, postoji značajan pad broja mikroorganizama te se zaustavlja njihov rast u inokuliranom farmaceutskom obliku lijeka, nakon propisanog vremena pri propisanoj temperaturi. Kriterij prihvaćanja, u smislu smanjenja broja mikroorganizama, ovisi o vrsti ispitivane formulacije. Mikroorganizmi koji se koriste u ispitivanju antimikrobne učinkovitosti konzervansa su vrste *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis* (1).

Priprema inokuluma

Bakterijske kulture se na prikladni mediju inkubiraju pri temperaturi 30-35 °C kroz 18-24 sati, kultura *C. albicans* pri 20-25 °C kroz 48 sati, te kultura *A. brasiliensis* pri 20-25 °C kroz jedan tjedan ili dok se ne postigne dobra sporulacija. Zatim se uzgojene kulture prenose u ispitivane formulacije i dobro miješaju zbog homogene raspodjele. Inokulirana formulacija se čuva pri temperaturi od 20-25 °C, zaštićena od svjetlosti. Uzima se uzorak iz svakog spremnika, uglavnom je to 1 ml ili 1 g u nultom vremenu (dalje prema propisanim intervalima), nakon čega se određuje broj živih mikroorganizama brojanjem na ploči ili membranskom filtracijom. Kriterij prihvatljivosti antimikrobne aktivnosti je opisan u tablici 12 (1).

Tablica 12. Kriterij prihvatljivosti antimikrobne aktivnosti za parenteralne pripravke, oftalmičke pripravke, intrauterine pripravke i intramamarne pripravke (prilagođeno prema literaturnom navodu (1))

		Log_{10} smanjenje				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
Bakterije	A	2	3	-	-	NR
	B	-	1	3	-	NI
Gljivice	A	-	-	2	-	NI
	B	-	-	-	1	NI

NR: bez oporavka.
NI: nema povećanja u broju živih mikroorganizama u usporedbi s prethodnim mjerenjem.
- : ne ispituje se u tom vremenskom periodu

Kriterij A izražavaju učinkovitost koja se želi postići. U opravdanim slučajevima kada se kriterij A ne može postići, na primjer, zbog povećanog rizika od nuspojava, kriterij B mora biti zadovoljen.

U kontekstu trenutnog nepovjerenja prema antimikrobnim konzervansima, proučavana je količina konzervansa u kapima za oko sa cisteaminom koje su konzervirane s BAK-om u koncentraciji 1 mg/ 5 ml. Testirano je pet otopina sa smanjenim koncentracijama BAK-a (0,5 mg/ 5 ml, 0,25 mg/ 5 ml, 0,1 mg/5 ml i 0 mg/5 ml BAK) u odnosu na ispitivanu otopinu (1 mg/ 5 ml BAK), odnosno provedeno je ispitivanje antimikrobne učinkovitosti konzervansa sukladno Europskoj farmakopeji. Svaka ispitivana otopina je inokulirana s 10^5 do 10^6 CFU po mililitru otopine. Inokulum ne smije prijeći vrijednost od 1% od ukupnog volumena otopine (37).

Kriterij prihvaćanja u smislu smanjenja broja mikroorganizama tijekom vremena varira s različitim kategorijama pripravaka. Četiri vrste mikroorganizama je korišteno u ispitivanju: sojevi*Pseudomonas aeruginosa* CIP 82,118, *Staphylococcus aureus* CIP 4,83, *Candida albicans* CIP 48,72 i *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (*Pasteur Institute Collection*). Ispitivane otopine u kojima je koncentracija konzervansa smanjena četiri puta u odnosu na referentnu otopinu, ostale su u skladu sa zahtjevima. Potrebno je napomenuti da je u farmaceutskom obliku lijeka bez konzervansa zabilježen rast gljivica, dok je logaritamska vrijednost smanjenja broja bakterija bila usklađena. Zaključeno je da je antimikrobna učinkovitost konzervansa očuvana uz deseterostruko smanjenje doze benzalkonijevog klorida. Međutim, sterilnost i antimikrobna učinkovitost nisu ispitane na kraju predloženog roka uporabe. Postavlja se pitanje što će biti s proizvodima koji su duže na tržištu, a u kojima je

koncentracija konzervansa, često proizvoljno određena od strane proizvođača, najčešće i maksimalno dopuštena koncentracija. Iako nije upitno da je upotreba konzervansa neophodna, količina konzervansa se može smanjiti bez ugrožavanja kakvoće oftalmičkog lijeka, no minimalna učinkovita koncentracija konzervansa još mora biti sa sigurnošću utvrđena (37).

4.5. Učinak površinski aktivnih tvari u oftalmičkim pripravcima na antimikrobnu učinkovitost konzervansa

U zadnjih 20 godina, zbog korištenja modela visokog kapaciteta probira novih molekula s farmakološkom aktivnošću, neionske površinske aktivne tvari se sve više koriste u farmaceutskim pripravcima iz razloga što su novi terapijski kandidati (molekule) slabo topljivi, odnosno prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije djelatnih tvari (BCS) pripadaju klasi II (slabo topljive i dobro permeabilne tvari) ili IV (slabo topljive i slabo permeabilne tvari). Neionske površinske aktivne tvari koriste se za povećanje bioraspoloživosti tvari BCS klase II ili IV. U usporedbi s kationskim, anionskim i amfolitskim površinski aktivnim tvarima pokazuju značajne prednosti (obzirom na kompatibilnost, stabilnost i toksičnost). Općenito su neionske površinski aktivne manje toksične, manje hemolitične i manje iritiraju površinu oka, a u otopini održavaju pH vrijednosti blizu fizioloških. Dobro poznati primjeri su polisorbati (polisorbat 80 ili Tween 80), poloksameri i tiloksapol. Široko se koriste u oftalmičkim lijekovima gdje imaju ulogu močenja, emulgiranja, otapanja i pojačavanja apsorpcije (38).

<u>Učinak na konzervanse</u>

Antimikrobna je učinkovitost BAK-a smanjena u prisutnosti neionske polioksietilirane površinski aktivne tvari (PNS) i potpuno inaktivirana pri koncentracijama PNS iznad CMC. Smanjenje ili gubitak antimikrobne učinkovitosti BAK-a proizlazi iz interakcija s PNS; primjerice, raspodjelom u micele ili stvaranjem miješanih micela PNS i konzervansa. Smanjenje antimikrobne aktivnosti kod drugih uobičajeno korištenih konzervansa u oftalmičkim pripravcima (kao što su klorobutanol, kloroheksidin, metilparaben i propilparaben) u prisutnosti neionskih površinski aktivnih tvari također je zabilježena.

Budući da samo slobodne molekule konzervansa imaju antimikrobni učinak, potrebno je detaljno ispitati njihove interakcije u svakom pojedinom farmaceutskom obliku oftalmičkog lijeka (38).

Oftalmički lijekovi u višedoznim spremnicima koji sadrže konzervans mogu sadržavati i PNS, a općeniti ključ sinergizma između površinski aktivnih tvari i konzervansa je formulirati takav sustav gdje je koncentracija površinski aktivne tvari ispod CMC. U slučajevima koji zahtijevaju koncentraciju površinski aktivne tvari iznad CMC, potrebno je dodati tvar koja će osigurati antimikrobni učinak konzervansa; primjerice, EDTA. Sama EDTA nema baktericidni učinak, ali uzrokuje neke strukturne promjene u staničnoj stijenci, posebno kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, a što olakšava unutarstanični prijenos konzervansa (38).

4.6. SIGURNOST PRIMJENE KONZERVANSA U OFTALMIČKIM PRIPRAVCIMA

4.6.1. Pretklinička ispitivanja sigurnosti primjene (*in vitro* i *ex vivo* metode)

Neklinička probirna (engl. *screening*) ispitivanja permeabilnosti lijeka omogućuju predviđanje bioraspoloživosti lijeka u ranim fazama razvoja oftalmičkog pripravka. Pri probirnim ispitivanjima permeabilnosti rabe se različiti *in vitro* i *ex vivo* modeli bioloških barijera oka.

In vitro ispitivanja su ispitivanja na staničnim modelima *in vitro* najčešće su metoda izbora u farmaceutskoj industriji za primarna probirna (engl. *primary screening*) ispitivanja permeabilnosti i/ili citotoksičnosti/citokompatibilnosti lijeka. Stanični su *in vitro* modeli velikog kapaciteta s obzirom na broj ispitivanjih uzoraka u jednici vremena (engl. *high-throughput models*), dok istodobno ne omogućuju dobro predviđanje bioraspoloživosti lijeka u ljudi (engl. *less predictive models*).

Ispitivanja permeabilnosti *ex vivo* uporabom svježe izoliranih animalnih i/ili humanih tkiva oka pružaju važne informacije o barijernoj ulozi takvih tkiva pri apsorpciji lijeka u oko. To su modeli relativno malog kapaciteta s obzirom na broj uzoraka koje je moguće ispitati u određenom vremenu (engl. *low- throughput models*), dok istodobno omogućuju dobro predviđanje intraokularne apsorpcije i bioraspoloživosti lijeka u ljudi (engl. *more predictive models*) (3).

Mnogo je pretkliničkih ispitivanja koja opisuju negativne učinke konzervansa, prvenstveno BAK-a. Relevantnost takvih rezultata u kliničkoj praksi ostaje nejasna. BAK je i dalje najzastupljeniji konzervans u oftalmičkim lijekovima za liječenje glaukoma i drugih poremećaja oka (36).

In vitro modeli

Humane stanične linije se koriste u većini *in vitro* ispitivanja, ali su zastupljeni i drugi modeli poput primarnih kultura stanica animalnog ili humanog podrijetla. Glavni parametar koji se ocjenjuje u ispitivanjima toksičnosti konzervansa je smrt stanice, no mogu se procijeniti i druga stanična svojstva poput stanične proliferacije i pojačavanje kornealne apsorpcije. Provedena ispitivanja su različito dizajnirana s obzirom na izlaganje BAK-u, u smislu koncentracije i duljine izlaganja. Glavno ograničenje takvih ispitivanja je ekstrapolacija dobivenih podataka u kliničku praksu. Na primjer,

jedan od problema interpretacije rezultata ispitivanja osjetljivosti rožnice je taj što se ispitivanja provode na jednom sloju stanica (36).

S ciljem unaprijeđenja modela u smislu biorelevantnih uvjeta ispitivanja, razvijeni su višeslojni modeli korištenjem različitih staničnih linija. Iako su učinci BAK-a prikazani u periodu neprekidnog izlaganja unutar 24 sata, kapi za oko s latanoprostom i olopatadinom (također konzervirane s BAK-om) su u periodu od 10-25 minuta pokazale slične toksične učinke kao i kapi za oko s travoprostom bez BAK-a. Za sva pretklinička ispitivanja treba uzeti u obzir da je izloženost BAK-u veća nego kod pacijenata kod kojih se kapi za oko brzo pomiješaju sa suznom tekućinom. No, kod pacijenata sa sindromom suhog oka ne dolazi do razrjeđenja kapi za oko sa suznom tekućinom, pa se ta činjenica koristi kao protuargument za sličnost *in vitro* ispitivanja i i realne *in vivo* situacije (36).

U određenom je ispitivanju pokazano da BAK u koncentracijama 0,05-0,1% (*m*/*V*) inducira lizu stanica stanične linije spojnice odmah nakon primjene kapi za oko, a izlaganje koncentraciji 0,01% (*m*/*V*) BAK-a unutar 24 sata izaziva apoptozu svih stanica (36).

Jedan zanimljivi pronalazak *in vitro* ispitivanja je da neki oftalmički hipotenzivi mogu smanjiti negativne učinke BAK-a. Naime, zabilježeno je da latanoprost i travoprost, ali ne i bimatoprost, štite stanice stanične linije spojnice od lize inducirane BAK-om (36).

Općenito, može se zaključiti da provedena *in vitro* ispitivanja mogu razjasniti podlogu staničnih mehanizama u potencijalnim učincima konzervansa i interakcija između konzervansa i djelatnih tvari. Ali nisu osobito korisne u procjeni kliničkog rizika za pacijenta, jer se većina provodi na jednom sloju stanica koje nisu primjereni model humane rožnice u uvjetima *in vivo* (36).

4.6.2. Klinička ispitivanja sigurnosti primjene (*in vivo* metode)

Biološka se ispitivanja farmakokinetike ili iritacije oka najčešće provode na kunićima (npr. novozelandski bijeli kunić), iako se ponekad koriste i druge životinjske vrste; primjerice psi, mačke, majmuni. Etički i znanstveno opravdane pokuse na životinjama obavljaju pravne osobe registrirane u RH za obavljanje navedne djelatnosti u skladu s pozitivnim propisima RH (39). Ispitivanje iritacije oka obavlja se na oku kunića pomoću Draize testa. U literaturi se često koriste različiti prilagođeni

oblici ispitivanja u skladu s Draize testom. Unilateralno se na površinu rožnice oka kunića primjenjuje ispitivani uzorak, a kontralateralno oko služi kao kontrola. Uzorak se primjenjuje jednokratno ili višekratno tijekom određenog vremena ovisno o tome ispituje li se akutna ili kronična iritacija oka. U određenim se vremenskim intervalima nakon primjene ispitivanog uzorka bilježe klinički znakovi iritacije i boduju u skladu sa skalom Draize testa (slika 5). Zbrajanjem iritacijskih bodova opaženih za svakog kunića i dijeljenjem s ukupnim brojem kunića izračuna se ukupna iritacija ispitivanog uzorka. Stupnjevi iritacije su: ne iritira (0-3), blago irirtira (4-8), umjereno iritira (9-12) i jako iritira (13-16) (3).

	Procjena	Bodovi
Rožnica		
a) Zamućenost	Odsutna	0
	Raspršena ili difuzna područja; detalji građe šarenice jasno vidljivi	1
	Lako primjetna poluprovidna područja; dijelovi šarenice blago mutni	2
	Opalescentna područja; detalji građe šarenice nevidljivi, veličina zjenice jedva primjetna	3
	Neprovidna; nevidljiva šarenica	4
b) Zahvaćeno područje	Odsutno	0
	Do četvrtine ili manje	1
	Više od četvrtine, ali manje od polovine	2
	Više od polovine, ali manje od tri četvrtine	3
	Od tri četvrtine do ukupnog područja	4
Zahvaćenost šarenice	Odsutna	0
	Nabranost veća od normalne, kongestija, oteklina i/ili cirkumokornealno ubrizgavanje; šarenica još reagira na svjetlo	1
	Reakcija na svjetlo odsutna, krvarenja i/ili velika oštećenja	2
Spojnica		
a) Crvenilo palpebralne spojnice	Normalne krvne žile	0
	Krvne žile vidljive više od normalnog	1
	Difuzno crvenilo, individualne krvne žile teško primjetne	2
	Jako izraženo difuzno crvenilo	3
b) Oteklina	Odsutna	0
	Svaka oteklina veća od normalne (uključujući treći kapak)	1
	Izražena oteklina s djelomičnim preokretanjem vjeđa	2
	Oteklina s vjeđama na pola zatvorenim	3
	Oteklina s vjeđama od na pola do potpuno zatvorenim	4
c) Iscjedak	Odsutan	0
	Svaka količina veća od normalne	1
	Iscjedak s vlaženjem vjeđa i dlake priljubljene uz vjeđe	2
	Iscjedak s vlaženjem vjeđa i značajnog područja oko oka	3

Slika 5. Skala bodovanja prema Draize za evaluaciju iritacije oka (prilagođeno prema literaturnom navodu (3))

Procjena stanja očne jabučice prije i poslije primjene ispitivanog pripravka vrši se promatranjem očne jabučice na odgovarajućem svjetlu, često koristeći povećalo ili biomikroskop, što osigurava precizniju procjenu. Pomoćni postupci koji pojednostavljuju vizualizaciju promjena uključuje bojenje s fluoresceinom i fotografiranje očne jabučice. Također, razinu nelagode nakon primjene ispitivanog pripravka može se odrediti i brojem treptanja i trljanja oka (10).

Posebna vrsta *in vivo* testa odnosi se na ispitivanje cijeljenja rana (engl. *wound healing studies*). Prati se proces regeneracije rožnice nakon mehaničkih ili kemijskih ozljeda. Erozije rožnice se boje fluoresceinom. Taj model omogućuje praćenje utjecaja konzervansa na cijeljenje rožnice, odnosno praćenje koliko je pod njihovim utjecajem cijeljenje rožnice usporeno/odgođeno (15).

Terapija izbora za većinu pacijenata koji boluju od glaukoma su kapi za oko. Ta se bolest dugotrajno liječi, preko nekoliko desetljeća, odnosno do kraja života. Prema podacima dostupnih iz kliničkih ispitivanja, podnošljivost terapije protiv glaukoma čini se zadovoljavajuća, uz nekoliko slučajeva intolerancije ili alergije na terapiju. Iako klinička ispitivanja relativno dobro demonstriraju sigurnosne profile novorazvijenih kapi za oko, treba naglasiti važnu razliku između kliničkih ispitivanja i upotrebe lijekova u stvarnom, svakodnevnom životu. Prije svega, klinička ispitivanja traju kratko (uglavnom između 6 mjeseci do godine dana). Toksičnost koja je ovisna o vremenu će možda tek nakon nekoliko godina korištenja lijeka biti klinički značajna, odnosno biti će značajno podcijenjena kratkim periodom provođenja kliničkog ispitivanja. Drugo, pacijenti najčešće dobiju jedan testni ili referentni farmaceutski oblik lijeka, te se ne obraća pozornost na moguće interakcije raznih sastojaka/tvari u farmaceutskom obliku. Također, zbog etičkih razloga, pacijenti s poznatom preosjetljivosti na konzervans ili pacijenti s istodobnom bolesti oka poput suhog oka, blefaritisa ili kronične alergije, se ne uključuju u ispitivanje, zbog toga što takva patološka stanja mogu snažno utjecati na toleranciju kapi za oko, dok će u stvarnom životu veća i raznolikija skupina bolesnika koristiti lijek (2). No, prevalencija suhog oka u pacijenata iznad 65 godina starosti varira između 15 i 34% (39). Konačno, u kliničkoj praksi, glaukom kao bolest često napreduje i zahtjeva dodatno liječenje, pa veliki dio pacijenata oboljelih od glaukoma istodobno primjenjuje višestruku terapiju.

Ispitivanje iz 2002. godine pokazuje da približno 40% pacijenata kojima je inicijalno dijagnosticirana okularna hipertenzija, nakon 5 godina terapije koristi 2 lijeka, a 9% pacijenata koristi tri ili više lijekova, dok se kod pacijenata afričko-američkog podrijetla bilježe i veći postotci. Višestruka terapija će vrlo vjerojatno povećati učestalost nuspojava, uz dodatak nuspojava svake pomoćne tvari farmaceutskog oblika, kao i moguće interakcije među djelatnim/pomoćnim tvarima različitih farmaceutskih oblika koji se istodobno primjenjuju. To je posebno bitno za konzervanse koji se mogu akumulirati i dostići visoke vrijednosti u očnim tkivima kada se ukapavaju 4 ili 5 puta dnevno (2).

U ispitivanju provedenom na zdravim dobrovoljcima, procijenjena je različita koncentracija BAK-a u umjetnim suzama za oko koje su korištene 8 puta dnevno kroz 7 dana. Čak i pri niskim koncentracijama BAK je inducirao gubitak vrčastih stanica i povećao odnos između volumena citoplazme i jezgre, dvjema karakteristikama suhog oka (41).

4.6.3. Čimbenici koji utječu na sigurnost primjene konzervansa

Tolerancija oka na konzervanse može se definirati kao sposobnost podnošenja određene doze kemijske tvari bez vidljivih znakova oštećenja tkiva oka. Metode ispitivanja tolerancije oka nisu propisane farmakopejama, no postoje smjernice po kojima se ispituje iritacija oka kako bi se ustanovio učinak pojedinog konzervansa na oko. U uobičajenim koncentracijama i pri manje učestalom doziranju, konzervansi koji se koriste u oftalmičkim pripravcima ne oštećuju oči, kao što to dokazuju milijuni svakodnevnih primjena diljem svijeta. Međutim, nuspojave izazvane konzervansima mogu se povećati u određenim okolnostima. Čimbenici koji utječu na sigurnost primjene su kombinacija konzervansa, stupanj čistoće, koncentracija, učestalost primjene, duljina primjene, stanje površine oka, kontaktne leće i sredstva za povećanje viskoznosti (15).

a) kombinacija konzervansa

Konzervansi se mogu kombinirati kako bi se proširio spektar antimikrobnog učinka. Na primjer, EDTA, stabilizirajuće i kelirajuće sredstvo koja ograničava oksidaciju raznih lijekova (u slučajevima

kada je metal katalizator), upotpunjuje učinak antimikrobnih konzervansa. Često se koristi u koncentraciji od 0,01–0,1% (*m*/*V*) s BAK-om ili nekim drugim konzervansom kako bi se pojačala antimikrobna aktivnost protiv sojeva bakterije *Pseudomonas* spp. Kombiniranje konzervansa u oftalmičkom pripravku utječe na toleranciju oka. Primjerice, dodatak EDTA (0,05%) u otopinu konzerviranu s kloheksidinom (0,025%) potiče morfološke promjene na površini rožnice što je utvrđeno elektronskom mikroskopijom, dok sam klorheksidin ne uzrokuje takvu promjenu (15).

b) kemijska čistoća konzervansa

Kemijska čistoća konzervansa koji se koristi u proizvodnji oftalmičkog pripravka utječe na toleranciju oka. BAK je smjesa alkildimetilbenzilamonijevih klorida, s duljinama alkilnih lanca između C8 do C18. Pokazano je da se tolerancija oka na konzervans mijenja ovisno o relativnim udjelima pojedinih alkilnih lanaca u smjesi, te da ja sirovina s alkilnim lancima duljine C12 manje toksična za oko (15).

c) koncentracija korištenog konzervansa

Koncentracija korištenog konzervansa kojoj je izloženo tkivo oka predstavlja linearnu vjerojatnost mogućnosti oštećenja površine oka. Ozbiljnost oštećenja oka povećava se s koncentracijom korištenog konzervansa. Točnije, pri koncentracijama ispod učinkovite antimikrobne koncentracije, oštećenja nema ili su vrlo mala, dok se pri deset puta većoj koncentraciji konzervansa, pojavljuju teža oštećenja površine oka (15).

Koncentracija konzervansa prisutnog u lijeku najčešće se izražava u postotku, odnosno kao masa konzervansa u volumenu otopine lijeka.

U *in vitro* ispitivanjima BAK pri koncentraciji 0,01% uzrokuje prekid u normalnoj citokinezi i mitotičkoj aktivnosti, te degeneraciju ljudskih epitelnih stanica rožnice u roku od 2 sata nakon primjene BAK-a (41).

Postoji dostatan broj pretkliničkih dokaza koji podržavaju hipotezu da izloženost visokim koncentracijama BAK-a kroz duže vrijeme rezultira nuspojavama na tkivu oka. S obzirom na kliničke

dokaze, rezultati su sugestivni, ali ne i dosljedni. Konkretno, dugoročna ispitivanja sigurnosti oftalmičkih otopina koje sadrže BAK nisu pokazala povećan broj slučajeva s oštećenom površinom oka prema koncentraciji BAK-a (36).

Ispitivanje provedeno s homolozima BAK-a s različitim duljinama alkil lanaca pokazala su obećavajuće rezultate (43).

d) učestalost primjene

Učestalost primjene kapi za oko koje sadrže konzervans može utjecati na na obim mogućeg oštećenja tkiva oka. Usporedbom umjerene (dvije kapi svakih 30 minuta kroz 2 sata, tj. osam kapi ukupno) i intenzivne (dvije kapi svake 3 minute kroz 1 sat, odnosno 40 kapi ukupno) učestalosti primjene oftalmičke otopine s 0,02 % BAK-a, primijećeno je četverostruko povećanje oštećenja rožnice pri intenzivnoj učestalosti primjene Umjerenom učestalošću primjene potaknute su minimalne morfološke promjene (djelomični gubitak mikrovila), dok intenzivno doziranje uzrokuje ozbiljne ultrastrukturne promjene (ljuštenje stanica, povlačenje granica stanične membrane i potpuni gubitak mikrovila) tkiva rožnice (15).

e) duljina trajanja terapije

Veliki je postotak pacijentata koji primijenjuju lijekove za oko lokalno nekoliko puta dnevno, tijekom nekoliko godina ili je terapija doživotna, kao u liječenju kroničnih očnih bolesti poput glaukoma, sindroma suhog oka ili alergije. Produljeno izlaganje epitela rožnice konzervansu povećava njegov potencijal nadraživanja oka. Za BAK se sumnja da pogoršava sindrom suhog oka kod pacijenata sa glaukomom. Nadalje, kod zdravih dobrovoljaca, primjenom beta-blokatora u obliku kapi za oko koje su konzervirane s BAK-om, pokazalo se da BAK smanjuje stabilnost suznog filma (15).

f) patofiziološko stanje rožnice

Oči koje su bile podvrgnute operacijskom zahvatu znatno su više osjetljive na štetne učinke nekih konzervansa koji usporavaju cjeljivanje rana ili utječu na permeabilnost rožnice (15). Promjene u

integritetu rožnice potaknute uklanjanjem epitela rožnice ili korištenjem konzervansa poput klorheksidina (0,01%, *m/V*) može značajno utjecati na prijenos nekih pomoćnih tvari preko barijere rožnice i dovesti do moguće toksičnosti. Nepovoljno djelovanje konzervansa je izraženije u starijih bolesnika i onih s bolestima površine oka (15). Čini se da su pacijenti različito osjetljivi na konzervanse kao i na aktivne tvari. Također, populacija oboljela od glaukoma je ujedno i populacija koja najčeće ima simptome suhog oka, stoga je moguće da postoji i podgrupa ljudi koja je vrlo osjetljiva na takve kemijske tvari, što je potrebno dodatno ispitati (36).

g) nošenje kontaktnih leća

Kontakne leće mogu u nekim slučajevima pojačati okularnu toksičnost konzervansa (15). Blaga abrazija rožnice može se pojaviti tijekom normalnog nošenja leća, kao i anoksija i trauma tijekom umetanja leće (15). Otopine za čišćenje i čuvanje leća najčešće sadrže konzervanse, a hidrofilni polimerni materijali koji se koriste za izradu mekih leća mogu adsorbirati kemijske tvari poput konzervansa. Iako takva adsorpcija nije sama po sebi štetna, kasnija desorpcija konzervansa s leće u oko predstavlja problem toksičnosti za oko (15).

h) sredstva za povećanje viskoznosti

Sredstva za povećavanje viskoznosti koriste se u oftalmičkim pripravcima u svrhu produljenja vremena kontakta rožnice i lijeka, odnosno povećanja bioraspoloživosti lijeka. Međutim, vrijeme kontakta konzervansa s rožnicom također je produljeno, što u određenim slučajevima može rezultirati oštećenjem oka. Primjerice, objavljeno je da hidrosietilceluloza (HEC), sredstvo za povećanje viskoznosti koje se često koristi u kapima za oko, produljuje vrijeme kontakta BAK-a s rožnicom oka na animalnom modelu kunića i rezultira oštećenjem epitela rožnice koje nije bilo opaženo pri korištenju samo BAK-a ili samo HEC (15).

U idealnom slučaju, konzervans treba udovoljavati brojnim zahtjevima kao što su široki spektar antimikrobnog učinka, kemijska i toplinska stabilnost, kompatibilnost sa spremnikom i drugim

tvarima farmaceutskog oblika lijeka, te neškodljivost i sigurnost oftalmičke primjene. Nažalost, niti jedan od konzervansa nije moguće univerzalno koristiti u svim oftalmičkim lijekovima jer niti jedan ne udovoljava svim navedenim zahtjevima. Naime, konzervansi koji učinkovito oštećuju stanice mikroorganizama također mogu biti toksični za stanice očnih tkiva. Pri odabiru konzervansa za oftalmički pripravak, mora se uzeti u obzir njegov iritacijski potencijal, pH područje unutar kojeg se postiže najveća antimikrobna učinkovitost, kompatibilnost s drugim sirovinama, sinergizam ili antagonizam antimikrobne aktivnosti, i uvjeti obrade (proizvodnog postupka), poput topline ili spremnika (15).

4.7. OFTALMIČKE NUSPOJAVE POVEZANE S PRIMJENOM KONZERVANSA

Problemi uzrokovani lokalnom primjenom konzervansa u oko razlikuju se prema zahvaćenom dijelu strukture oka (15). Pitanje je li BAK ulazi u oko ili se infiltrira u očna tkiva važno je s obzirom da potencijalno štetna tvar može uzrokovati male toksične učinke u kratkotrajnoj upotrebi, ali se ona često koristi kroz cijeli pacijentov život i može se akumulirati u tkivima. Dosad je samo jedno ispitivanje objavilo farmakokinetičke podatke za BAK nakon topikalne oftalmičke primjene. Nakon primjene jedne kapi od 30 µl pripravka koji sadrži BAK u koncentraciji 0,01% (*m*/*V*) u oko kunića, BAK je pronađen u tkivima oka i nakon 168 sati nakon samo jedine primijenjene kapi. Vrijeme polueliminacije BAK-a u epitelu rožnice i tkivima spojnice je 20 sati, dok je u dubljim strukturama oka 11 sati. To je važno jer se suzama može značajno smanjiti toksičnost na površini oka, no dublje strukture oka će ipak biti izložene konzervansu nakon dulje upotrebe konzerviranih kapi za oko (2).

4.7.1. Konzervansi i spojnica oka

Spojnica je dio kapka, delikatna opna koja oblaže stražnju stranu kapka i pokriva prednji dio očne jabučice te doprinosi lučenju suza i ima zaštitnu funciju. Tkivo spojnice može reagirati na brojne načine, kao odgovor na lokalnu primjenu lijekova za oko. Mehanizmi kojima spojnica može reagirati uključuju stvaranje ožiljnog tkiva, alergijske reakcije, konjunktivitis, pojava iscjetka zbog upale (15). Neki konzervansi mogu izazvati nepovoljne učinke na spojnici. Na primjer jedna aplikacija kapi za oko koje sadrže BAK u koncentraciji 0,02% može izazvati blagu hiperemiju spojnice kod ljudi (15).

4.7.2. Konzervansi i suzni film

Oftalmička toksičnost konzervansa nakon topikalne primjene očituje se izravno mijenjanjem anatomskog i fiziološkog integriteta epitela rožnice ili neizravno mijenjanjem suznog filma. Usko vezan na epitel rožnice, suzni film ima nekoliko važnih funkcija, poput optičke i metaboličke funkcije, te zaštitu oka od dehidracije i vanjskih štetnih utjecaja. Suzni film je troslojna tekućina debljine 7 μm građena od lipidne, vodene i gel faze. Nestabilnost suznog filma najčešće rezultira sindrom suhog oka. Poremećaji se suznog filma ispituju različitim kliničkim testovima uključujući neinvazivni test pucanja suznog filma, Schirmerov test, fluorescein i Rose Bengal bojenje i biomikroskopija (15).

Umjetne suze su glavni način liječenja svih oblika nedostatka suza. Osim polimera, umjetne suze sadrže i konzervanse. Najčešće korišteni konzervans je BAK koji narušava stabilnost lipidnog sloja suznog filma (15).

4.7.3. Konzervansi i rožnica

Citotoksičnost se odnosi na potencijalne štetne učinke kemijskih tvari prema stanicama i uglavnom je nespecifična. Konzervansi ovisno o kemijskoj strukturi na više načina utječu na mikroorganizme. Primjerice, alkoholni spojevi narušavaju bakterijsku membranu, povećavaju propusnost, uzrokujući gubitak citoplazmatskog sadržaja; fenolne kemijske tvari razaraju staničnu stijenku i citoplazmatske membrane, također uzrokuju lizu stanice; kvarterni amonijevi spojevi zbog svojih površinski aktivnih svojstava razbijaju staničnu membranu i talože citoplazmatske enzime; sorbinska kiselina inhibira bakterijski enzim fumarat reduktazu; klorheksidin inhibira transmembranski transport kalija; živini konzervansi utječu na mikrobne enzime umetanjem svojih tiolnih skupina uzrokujući smrt mikroorganizma (15).

Citotoksični učinak konzervansa na ljudskim stanicama, može biti izražen kroz morfološke promjene (promatrano histokemijskim i mikroskopskim tehnikama), kroz promjene cjelovitosti membrane ili staničnog metabolizma (dokazano propuštanje ili apsorpcija različitih markera), kroz elektrofiziološke prekide (praćeno mikroelektrodama) ili upalnim odgovorom (praćenje upalnih faktora). Razvijene tehnike kultura tkiva rožnice dozvoljene su za procjenu oftalmičke citotoksičnosti konzervansa.

Međutim, mora se uvažiti da su izolirane stanice bez normalnog mucinskog sloja i puferskog suznog filma; te su izložene ispitivanim tvarima dulji vremenski period nego u stvarnosti; zato uvijek treba imati na umu pitanje kliničkog značaja stanične citotoksičnosti. Pomoću elektronske mikroskopije, opisan je tipični slijed morfoloških citotoksičnih događaja na staničnoj razini. Prvi učinak je gubitak mikrovila vanjskih epitelnih stanica, nakon čega slijedi gubitak mikrovila s cijele površine. Nakon toga nestaju kontakti između susjednih stanica, a prve stanice koje prolaze proces apoptoze se opažaju kao naborane i zgrčene. Konačno, nakon uklanjanja površinskog sloja stanica, isti proces prolaze i ostali (dublji) slojevi stanica. Mnoga *in vitro* ispitivanja pokazuju citotoksičnost konzervansa. Primjerice, BAK inducira stanične fiziološke promjene i narušava vijabilnost stanica epitela rožnice ili spojnice oka (15).

Rožnica ima dvije glavne funkcije: zaštita intraokularnog sadržaja i refrakcija svjetlosti. Zbog svog položaja, rožnica je tkivo oka najviše izloženo vanjskim štetnim utjecajima. Oštećenja na rožnici mogu biti uzrokovana konzervansima sadržanim u topikalnim oftalmičkim pripravcima. Neki tipični primjeri toksičnih učinaka induciranih na rožnici učinkom konzervansa prikazani su tablicom 13. Prema kemijskoj klasi konzervansa prikazana su zabilježena oštećenja oka, a navedene su i koncentracije i režim primjene ispitivanih konzervansa.

Tablica 13. Toksični učinci konzervansa na oko (prilagođeno prema literaturnom navodu (15))

Kemijska klasifikacija konzervansa	Konzervans (uobičajena koncentracija, %)	Oštećenje oka koje uzrokuje konzervans	Korištena koncentracija (režim primjene[a])
Kvarterni amonijevi spojevi	**Benzalkonijev klorid (0,01)**	Usporeno cjeljivanje rane nakon lamelarne keratoplastike	0,02% (4/12)
		Gubitak epitelnih stanica, razaranje membrane	0,01% (1)
		Teško oštećenje keratocita strome rožnice	0,02% (9/2)
		Blagi edem endotela rožnice podvrgnutog keratektomiji	0,02% (9/2)
		Teško ljuštenje stanica rožnice, gubitak mikrovila	0,05% (1)
		Destabilizacija suznog filma u smislu brze pojave suhe točke na rožnici	0,0001% (1)
		Skraćeno vrijeme pucanja suznog filma	0,005% (1/3)
		Osjećaj peckanja ili suhog oka	0,01%
Kelatori	**EDTA (0,01 – 0,1)**	Ne usporava cjeljivanje rane nakon lamelarne keratoplastike	0,1% (4/8) 0,005% (3/1)
		Blagi osjećaj peckanja	0,34% (1)
		Jako peckanje	1,0% (1)
Alkoholi	**Klorobutanol (0,5)**	Ne usporava cjeljivanje rane nakon lamelarne keratoplastike	0,004% (4/6)
		Nema reakcije na rožnici	2% (2/7)
		Povremeno pucanje membrane, povremeni edem strome rožnice	0,5% (9/2)
Ostali	**Klorheksidin (0,01)**	Stalna blaga iritacija i povremena pojava neprozirnosti rožnice	0,005%[b]
		Crvenilo oka, bol, smanjena sposobnost vida, edem rožnice	4% (1)
	Parabeni (0,1)	Usporeno cjeljivanje rane nakon oštećenja rožnice	2% (1)
		Osjećaj peckanja	0,02 – 0,04% (1)

[a] broj primjena/ broj dana; (1) predstavlja jednu primjenu

[b] 6 sati kontakta oka s mekom kontaktnom lećom s adsorbiranim konzervansom iz otopine konzervansa

Analizom navedenih oštećenja površine oka moguće je zaključiti da konzervansi s površinski aktivnim svojstvima (primjerice, BAK) solubiliziraju membranu epitelnih stanica rožnice; pri niskim koncentracijama uzrokuju gubitak mikrovila s površine epitelnih stanica, dok pri višim koncentracijama uzrokuju ljuštenje epitelnih stanica. I drugi konzervansi s površinski aktivnim svojstvima također ulaze u interakciju sa staničnim proteinima: polarna glava molekule kationskog spoja (primjerice, BAK) ulazi u interakciju s anionskim ostatcima proteina koji sadrže glutamat i aspartat. Oštećenje endotela, najdubljag sloja rožnice koji se ne obnavlja, značajno je ozbiljnije od oštećenja epitela rožnice te ga prati edem rožnice što rezultira gubitkom providnosti rožnice (15).

Dugotrajna primjena topikalnih oftalmičkih lijekova koji sadrže konzervans BAK izaziva toksičnu degeneraciju endotela rožnice što zahtijeva transplantaciju rožnice. Međutim, kod „niskog“ režima primjene (šest puta na dan tijekom 7 dana) 0,005 % (*m*/*V*) otopine BAK-a nisu primijećene patološke promjene oku kunića. Ipak, štetni učinci BAK-a na endotelu rožnice kunića mogu se povećati u slučaju primjene smjese BAK/EDTA ili ako je se BAK koristi na keratektomiziranim očima (15). Parabeni također uzrokuju morfološke promjene na endotelu rožnice kunića (15).

Za konzervanse koji se koriste u topikalnim kapima za oko opažen je učinak povećanja permeabilnosti rožnice za lijekove. Učinak je posebno izražen za BAK kao površinski aktivne tvari s nespecifičnim baktericidnim učinkom. BAK jednako solubilizira membrane stanica mikroorganizama i epitelnih stanica rožnice (15).

Brojni su autori objavili povećanje propusnosti rožnice za različite obilježivače (fluorescein, inulin, peroksidaza) i lijekove (prednizolon, pilokarpin, beta-blokatori) u prisutnosti BAK-a (15). Oftalmički pripravci koje sadrže timolol bez konzervansa, jednako su učinkoviti kao i konzervirani pripravak u pacijenata oboljelih od glaukoma, uz smanjeni osjećaj peckanja ili suhog oka (15). Međutim, unatoč povećanoj propusnosti rožnice učinkom konzervansa, nije moguće dovoljno povećati propusnost rožnice bez izazivanja neprihvatljivog oštećenja oka. Konzervanse nije moguće koristiti kao klinički prihvatljive pojačivače apsorpcije oftalmičkih djelatnih tvari (15).

Metoda MiFALC (engl. *Microtitration Fluorimetric Assays on Live Cells*) omogućava ispitivanja na živim stanicama u skladu s preporukama Europskog povjerenstva za validaciju alternativnih metoda (engl. *European Commitee for the Validation of Alternative Methods*), a prema takvoj metodi su ispitivani mnogi lijekovi protiv glaukoma i njihovi konzervansi. Svi su konzervansi, čak i pri niskim koncentracijama, citotoksični za stanice oka i odgovorni su za apoptozu stanica i stvaranje slobodnih radikala. S druge strane, većina djelatnih tvari takvih lijekova nije inducirala niti jedan mehanizam apoptoze stanica (2).

Konzervansi koji se koriste u postoperativnom liječenju nakon kirurških operacija (primjerice, keratoplastika) mogu negativno utjecati na brzinu cijeljenja rana i ometati proces ponovne epitelijalizacije rožnice. Ispitivanja pokazuju da BAK može značajno odgoditi regeneraciju epitela rožnice. Mehanizam kojim BAK usporava liječenje rožnice uključuje oštećenje anatomske i fiziološke difuzijske barijere, moguće uslijed oštećenja membrana stanica (15).

4.7.4. Konzervansi i alergije

Suprotno raširenom mišljenju, alergijske reakcije su mnogo rjeđe od toksičnih reakcija, čineći približno 10 % svih oftalmičkih nuspojava (15). Lokalna iritacija oka BAK-om se često interpretira kao alergija koja se zatim bezuspješno liječi antihistaminicima, dok je mehanizam nastanka nuspojave sasvim drugačiji (42). Međutim, iako je rijetka, potencijalna alergenost konzervansa u oftalmičkim pripravcima, ne smije se podcijenjivati jer može izazvati komplikacije poput nastajanja rana spojnice i produženja simptoma tijekom liječenja (15).

Tri su važna predisponirajuća čimbenika alergijskih reakcija: individualna osjetljivost, produljena uporaba lijekova i već postojeće kožne bolesti kapaka. Alergijske kontaktne reakcije javljaju se nakon senzibilizacije T limfocita u regionalnim limfnim čvorovima i predstavljaju tip IV (odgođenu) preosjetljivost po Gell i Coombsovoj klasifikaciji. Topikalni lijekovi djeluju kao hapteni (djelomični antigeni) koji s proteinima tkiva čine kompletne antigene koji zatim mogu senzibilizirati limfocite i pokrenuti upalnu reakciju. Takva se osjetljivost može razvijati tjednima ili godinama, ali jednom kad je bolesnik senzibiliziran, alergijske se reakcije mogu pojaviti u samo 48 sati. Istraživanje takvog tipa

reakcija obično se izvodi pomoću *patch* testa. Dokaz alergijske kontaktne reakcije uključuje: folikularni konjuktivitis, egzematoidni blefaritis, periokularni dermatitis kojemu prethodi crvenilo spojnice, iscjedak i edem. Ostali simptomi obuhvaćaju svrbež i osjećaj peckanja u oku, epifora, fotofobija i osjet stranih tijela u oku. Glavni konzervansi koji su uključeni u alergijske kontaktne reakcije su tiomersal, klorheksidin, EDTA, benzetonij klorid, BAK i sorbinska kiselina (15).

Tablica 14 daje pregled karakterističnih reakcija tkiva oka na primjenu konzerviranih kapi za oko, ovisno o tipu reakcije. Jačina simptoma i znakova koji se javljaju ovise i o osjetljivosti pojedinih pacijenata na pojedini konzervans ali su to također i simptomi koji će kod pacijenata vrlo često uzrokovati nesuradljivost i prekid terapije lijekom (29).

Tablica 14. Karakteristične reakcije tkiva oka na primjenu konzerviranih kapi za oko (prilagođeno prema literaturnom navodu (29))

Vrsta reakcije	Mehanizam	Simptomi	Znakovi
Alergija	Aktivacija imunološkog sustava	Svrbež	Crvenilo
Toksičnost	Direktno oštećenje stanica	Osjećaj peckanja	Crvenilo, oštećenje epitela rožnice
Intolerancija	Iritacija	Nelagoda	Nespecifično
Osjetljivost	Individualno	Nelagoda	Nespecifično

4.7.5. Konzervansi i kontakne leće

Nošenje kontaktnih leća može dovesti do raznih oftalmičkih nuspojava s obzirom da umetanje i nošenje leće na rožnici izaziva blagu abraziju ili traumu, što pak čini preduvjet za infekcije rožnice jer je leća medij za uvođenje patogena u prednji segment oka. Iz tog razloga, korištenje konzervansa se ponekad zahtjeva u otopinama za čuvanje kontaktnih leća, kao što propisuje švicarska farmakopeja (Pharmacopoeia Helvetica, Ph. Helv.). Međutim, druge relevantne farmakopeje, poput europske (Ph.Eur.) i američke (USP/NF) farmakopeje, ne propisuju dodatak konzervansa u otopine za čuvanje kontaktnih leća (15).

Pored drugih pomoćnih tvari (kao što su površinski aktivne tvari, enzimi, oksidirajuća sredstva, sredstva za povećanje viskoznosti, sredstva za puferiranje i sredstva za prilagodbu toničnosti), konzervansi se koriste i u različitim otopinama za kontaktne leće. Konzervansi su sadržani u otopinama za čišćenje (u cilju otklanjanja proteinskih, lipidnih, mineralnih, okolišnih ili kozmetičkih naslaga koje se nakupljaju na površini kontaktnih leća), otopinama za namakanje ili dezinfekcijskim otopinama (koriste se za uklanjanje mikroorganizama tijekom čuvanja kontaktnih leća, dok se leće ne nose), otopinama za ispiranje (koriste se za uklanjanje ostatka otopine za čišćenje) i otopinama za vlaženje (koriste se za ovlaživanje i podmazivanje granične površine leće i rožnice). Konzervansi mogu negativno utjecati na kontaktne leće i površinu oka (15). BAK može uzrokovati promjenu boje mekih kontaktnih leća te se isto upozorenje navodi u svim uputama o lijeku za oftalmičke pripravke koji sadrže BAK kao konzervans (25).

Kao što je već spomenuto, meka kontaktna leća može biti spremnik različitih tvari, čime se produljuje kontakt adsorbiranih tvari i površine oka. Iz tog razloga, tvari koje u oftalmičkim pripravcima inače nisu toksične za oko, mogu postati toksične kada se koriste u kombinaciji s mekim kontaktnim lećama (15).

Kada se koristi u kombinaciji s mekim kontaktnim lećama, klorobutanol uzrokuje blagi konjunktivitis. Konačno, BAK čiji je prijenos u oko s meke kontaktne leće izražen, povećava ljuštenje epitela rožnice i uzrokuje upalu oka. Unatoč prilično širokoj primjeni u keliranju kalcija iz depozita leća, EDTA samo povremeno rezultira alergijskim reakcijama. Tvrde leće imaju iste probleme kao meke leće, ali u mnogo manjoj mjeri, jer su općenito manjeg adsorpcijskog kapaciteta za konzervanse (15).

U jednom ispitivanju određena je apsorpcija i desorpcija BAK s tvrdih i mekih kontaktnih leća. Adsorpcija na meke kontaktne leće nakon 7 dana kontinuiranog izlaganja je visoka (30 do 56 μg/mg kontakne leće) s niskim postotkom (0,2-1,5 %) ispiranja tijekom 24 sata. Leća s visokim sadržajem vode adsorbira veću količinu BAK-a nego leća sa nižim sadržajem vode. Tvrde leće adsorbiraju puno manju količinu BAK-a, ali desorbiraju između 30% i 60% od ukupnog unosa tijekom ispiranja unutar

24 sata. Desorbirani BAK bilo iz meke ili tvrde leće postiže koncentracije iznad dozvoljene gornje granice sigurnosti (44).

4.7.6. Konzervansi kao uzročnici jatrogenih bolesti oka

Topikalni oftalmički lijekovi ponekad mogu izazvati toksične ili alergijske reakcije rezultirajući jatrogenim bolestima oka. Toksične reakcije odnose se na izravnu kemijsku iritaciju tkiva, dok alergijske reakcije podrazumijevaju osjetljivost i pojavu upalnog procesa oka zbog aktivacije imunosnog sustava. Takvi štetni učinci oftalmičkih lijekova nastaju zbog lokalno primjenjenog lijeka, djelatne i/ili pomoćnih tvari sadržanih u pripravku. Od svih pomoćnih tvari, nuspojave oftalmičkih lijekova najčešće uzrokuju konzervansi (2).

4.7.7. Ostale nuspojave koje uzrokuje BAK – Sindrom suhog oka i površinske bolesti oka

BAK u oku potiče alergijski mehanizam kao iritans koji nadražuje površinu oka, što se može manifestirati kao alergijski ili nealergijski blefaritis, disfunkcija Meibomovih žlijezda, kronična upala spojnice ili kao nestabilnost suznog filma. Uslijed toksičnih i proupalnih učinaka, BAK može uzrokovati ili pogoršati sindrom suhog oka i alergijski konjunktivitis. Ispitivanja provedena na ljudima pokazala su da se broj vrčastih stanica značajno smanjuje nakon kratkotrajnog izlaganja BAK-u ili nakon izlaganja kapima za oko s timololom koje sadrže BAK. Osim toga, kao površinski aktivna tvar, BAK solubilizira lipidni sloj suznog filma, što uzrokuje gubitak vodenog sloja suznog filma uslijed prekomjernog isparavanja. Rezultat oba mehanizma, odnosno promjena lipidnog i mucinskog sloja suznog filma, rezultira pogoršanju simptoma sindroma suhog oka (40). Promjene suznog filma mogu dodatno potaknuti biološke promjene na površini oka što dovodi do posljedične neurogene upale i daljeg smanjena stabilnosti suznog filma (2).

Sindrom suhog oka je multifaktorijalna bolest suza i površine oka koja rezultira simptomima neudobnosti, poremećaja vida te nestabilnosti suznog filma, s mogućim oštećenjem površine oka. Praćena je povišenom osmolarnošću suznog filma i upalom površine oka. Danas se terapija suhog oka

sastoji u korištenju umjetnih suza kako bi se uspostavila normalna homeostatska ravnoteža površine oka i suznog filma. Posebna skupina su pacijenti s glaukomom, kod kojih je nelagoda oka najčešće rezulat sadržaja BAK-a u antiglaukomskim lijekovima koji se kronično primjenjuju. BAK smanjuje stabilnost suznog filma na način da solubilizira lipidni sloj, modificira mucinski sloj, uzrokuje apoptozu epitelnih stanica spojnice i smanjuje broj vrčastih stanica koje izlučuju mucin. Uslijed toga dolazi do evaporacije vodenoj sloja suznog filma i posljedične destabilizacije suznog filma, što pak utječe na kvalitetu vida i pojavu simptoma poput pijeska u očima, žarenja i peckanja. Za BAK je poznato da su nuspojave povezane s koncentracijom i učestalošću doziranja, no većina nuspojava je reverzibilna i nestaje nakon prestanka primjene oftalmičkog lijeka koji sadrži BAK (45).

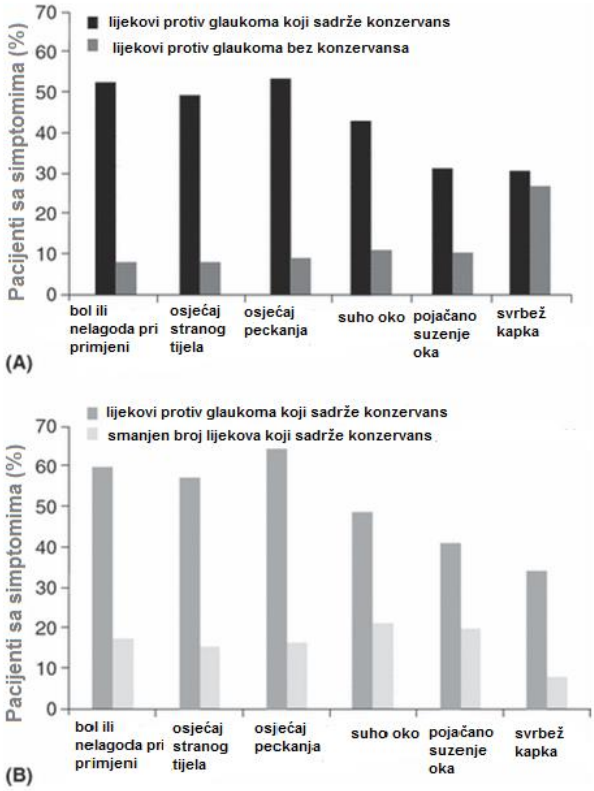
Također je pokazano da BAK može uzrokovati nuspojave na drugim organima i organskim sustavima. Primjerice, udisanjem BAK-a u otopljenom stanju i pri koncentracijama koje se najčešće koriste u oftalmičkim otopinama, zabilježena je pojava bronhokonstrikcije kod pacijenata s astmom (2).

4.8. ALTERNATIVNI OFTALMIČKI PRIPRAVCI BEZ DODATKA KLASIČNIH KONZERVANSA

Alternative korištenju nadražujućih konzervansa u oftalmičkim pripravcima uključuju razvoj bolje podnošljivih konzervansa i suvremene spremnike za pakiranje oftalmičkih lijekova (15).

Intenzivna se istraživanja provode na području razvoja suvremenih konzervansa u odnosu na BAK i druge kvarterne amonijeve spojeve. S obzirom da konzervans mora istodobno imati snažan antimikrobni učinak i biti netoksičan za stanice prednjeg segmenta oka, komercijalno je dostupno i odobreno za uporabu samo nekoliko suvremenih konzervansa (2).

U usporedbi s konzerviranim oftalmičkim pripravcima, oftalmički pripravci bez konzervansa su značajno manje povezani s očnim simptomima i znakovima iritacije (46) kao što je to i vidljivo iz slike 6.



Slika 6. Učestalost oftalmičkih simptoma u (A) pacijenata koji su konzervirane oftalmičke lijekove zamijenili alternativnim oftalmičkim lijekovima bez konzervansa i (B) pacijenata koji su smanjili izloženost oftalmičkim lijekovima s konzervansima (prilagođeno prema literaturnom navodu (46))

4.8.1. Inovativni konzervansi

Glavni je izazov razviti novih kemijske entitete za konzerviranje oftalmičkih pripravaka koji se bolje podnose i manje su toksični, dok istodobno osiguravaju učinkovitu antimikrobnu zaštitu od sekundarne kontaminacije oftalmičkih pripravaka (15).

Polyquad i **Dymed** su konzervansi koji su se pojavili 1990-tih godina i općenito imaju obećavajuća svojstva. Polyquad (polidronijev klorid, polyquaternium -1) je molekula velike molekulske mase koja se koristi u otopinama za kontaktne leće i umjetnim suzama. Vrlo je učinkovit u sprječavanju rasta mikroorganizama, osobito gljivica, te se čini da ga pacijenti dobro podnose (15). Najčešće je korišten za višenamjenske otopine za leće. Pokazuje dobar sigurnosni profil i dobru toleranciju u usporedbi s ostalim otopinama konzervansa (2). Osim što je kao konzervans oftalmičkih lijekova odobren i u RH, koristi se i u Opti-free express (Alcon) otopinama za leće, gdje se Polyquad kombinira s miristamidpropildimetilaminom (Aldox). Naime, sam Polyquad ne pokazuje zadovoljavajuću antimikrobnu učinkovitost protiv ameba iz roda *Acanthamoeba* (47). Dymed je poliaminopropil bigvanid (PAPB) i pripada skupini klorheksidina (48). U RH nije odobren kao konzervans u oftalmičkim lijekovima, ali je sadržan u otopinama za kontakne leće (primjerice, Renu MultiPlus je višenamjenska otopina za kontakne leće koja sadrži Dymed pri koncentraciji 0,00005%).

Natrijev perborat je relativno novi konzervans. Unutar spremnika lijeka se generira vodikov peroksid i vrlo je učinkovito antimikrobno sredstvo, a nakon što otopina lijeka dođe u kontakt sa suznim filmom, vodikov peroksid se endogenim enzimima pretvara u vodu i kisik (15). Natrijev perborat ima inhibitorski učinak protiv bakterija, gljivica i virusa. Međutim, u otopini, osim generiranja vodikovog peroksida, može generirati i slobodne radikale klor-dioksida, koji oksidiraju nezasićene lipide i glutation u stanicama površine oka (16).

Sorbinska kiselina se inače široko upotrebljava kao konzervans za hranu, a predložena je kao alternativa BAK-u, u slučajevima dobre kompatibilnosti s drugim sastavnicama oftalmičkog lijeka. Sorbinska kiselina inhibira bakterijski enzim fumarat reduktazu (15).

Najnoviji konzervans je stabilizirani oksikloro kompleks pod nazivom **Purite** (sadrži 995% ClO_2^-, 0,5% ClO_3 i tragove ClO_2) koji se na svjetlu razgrađuje na natrijev klorid i vodu (16). Već je 1940-tih godina uveden u oftalmičke pripravke, a u današnje je vrijeme sastavni dio otopine umjetnih suza (Refresh Tears, Allergan) i oftalmičkih lijekova za liječenje glaukoma s brimonidim tartaratom (Alphagan P, Allergan). Tako konzervirane oftalmičke otopine se nakon otvaranja mogu koristiti 90 dana (49). Učinak konzervansa Purite na oko kunića uspoređivan je s učinkom oftalmičkih lijekova za liječenje glaukoma koji su sadržavali BAK. Nakon 30 dana korištenja, na rožnici i spojnici uočeno je značajno više promjena koje su izazvale kapi za oko konzervirane BAK-om u odnosu na kapi za oko konzervirane s Purite. Purite također pojačava transkornealni prijenos brimonidina u očnu vodicu što omogućuje sniženje koncentracije brimonidina od 0,15-0,2% bez terapijskih promjena u snižavanju IOP. Klinički gledano, dvije promjene u formulaciji oftalmičkog lijeka – zamjena BAK-a s Purite i sniženje koncentracije brimonidina – rezultirale su značajnim poboljšanem tolerancije, posebno kod bolesnika s osjetljivim i nadraženim okom (2).

Natrijev (hidroksimetil)glicinat (SHMG) je često korišten konzervans u proizvodima za osobnu njegu. Prema Europskoj Direktivi 76/768/EEC izmjenjenoj Direktivom 96/41/EC, SHMG je dozvoljen konzervans u koncentraciji do 0,5% bez posebnih ograničenja pri uporabi. U Italiji su odobrene umjetne suze pakirane u višedozne spremnike koje sadrže inovativni konzervans u obliku smjese 0,002% SHMG i 0,1% EDTA. Pokazano je da SHMG ima široki bakteriostatski učinak u koncentracijama od 0,0025% do 0,0125%, a više su koncentracije potrebne za fungistatsku aktivnost protiv *C. albicans* i *A. niger*. Dodatak 0,15% EDTA u otopinu SHMG značajno smanjuje minimalnu koncentraciju SHMG potrebnu za bakteriostatski i fungicidni učinak *in vitro*. U takvoj smjesi, koncentracije SHMG od 0,005% do 0,025% dovoljne su za sprječavanje rasta i uništavanje svih ispitanih mikroorganizama. Također, učinkovitost smjese SHMG i EDTA u zaštiti otopine umjetnih suza od mikrobnog onečišćenja, ispitana je testovima učinkovitosti konzervansa opisanim u američkoj i europskoj farmakopeji. Antimikrobna aktivnost smjese SHMG i EDTA pokazala je ovisnost o sastavu otopine umjetnih suza i bila je različita za različite ispitane mikroorganizme. Sve testirane kapi

za oko udovoljile su svim kriterijima američke i pojedinim kriterijima europske (EP-B) farmakopeje, ali ne i strožim (EP-A) kriterijima europske farmakopeje (50).

Sofzia (smjesa boratne kiseline, propilenglikola, sorbitola i cinkovog klorida) pripada skupini suvremenih konzervansa. Uspoređivan je broj vrčastih stanica nakon kronične uporabe kapi za oko koje sadrže latanoprost konzerviran s 0,02% BAK-a i kapi za oko s travoprostom koji je konzerviran suvremenim Sofzia konzervansom ili umjetnim suzama bez konzervansa. Opaženo je značajno smanjenje broja vrčastih stanica u skupini pacijenata koji su primjenjivali kapi za oko konzervirane s BAK-om u odnosu na pacijante koji su primjenjivali kapi za oko konzervirane Sofzia konzervansom, odnosno koji su primjenjivali umjetne suze bez konzervansa (2).

Iako nove kemijske tvari obećavaju, treba imati na umu da je vrlo teško razviti konzervans koji je učinkovit protiv mikroorganizama, a istodobno siguran za oftalmičku primjenu jer problemi sigurnosti primjene konzervansa najčešće proizlaze iz njegovog nespecifičnog učinka (15).

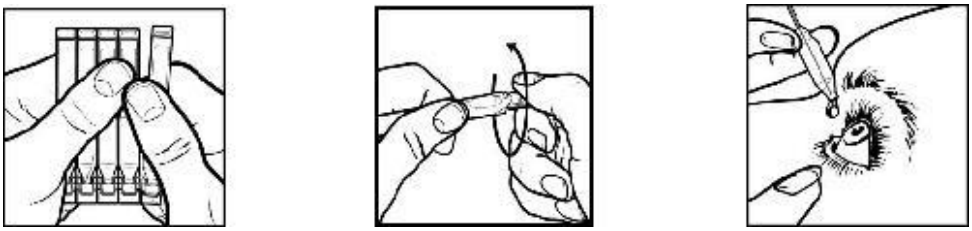
4.8.2. Jednodozni spremnici oftalmičkih lijekova bez konzervansa

Europska farmakopeja zahtjeva jednodozne spremnike oftalmičkih lijekova u slučaju ozlijede oka, tijekom pregleda ili operacije oka ili kada je poželjno da oftalmički lijek ne sadrži konzervans (primjerice u liječenju sindroma suhog oka). Takvi spremnici su se pojavili 1965. godine u Velikoj Britaniji (15).

Jednodozni spremnici su obično izrađeni od polietilena niske gustoće i sastoje se od cijevastog, elastičnog tijela koje se može stisnuti prstima i šiljastog vrha s *twist-off* čepom (slika 8). Glavna prednost jednodoznih spremnika je uklanjanje rizika od kontaminacije oftalmičkog lijeka u odsutnosti konzervansa jer se otvoreni spremnik mora baciti nakon primjene ili na kraju dana. Takav dozni oblik dobro je prilagođen nekontinuiranoj primjeni, primjerice, za oftalmičke dijagnostičke pripravke ili prije odnosno poslije operativnih zahvata. Iako su jednodozni spremnici idealni za oftalmičke otopine bez konzervansa, imaju neke nedostatke; prilično su skupi, a kronična primjena oftalmičkih lijekova pakiranih u jednodozne spremnike pridonosi značajnom povećanju otpada otopine lijeka i plastične

ambalaže. Trošakovi proizvodnje kapi za oko pakiranih u jednodozne spremnike su pet do deset puta veći od troškova proizvodnje kapi za oko pakiranih u višedozne spremnike. Također, pri otvaranju jednodoznog spremnika, čak i pomoću škara, teško je postići identičan otvor spremnika, tako da veličina kapi za oko, a time i doza primijenjenog lijeka varira ovisno o dimenzijama otvora pri pojedinačnoj primjeni. Nadalje, pri uklanjanju *twist-off* čepa može zaostati oštar rub na otvoru jednodoznog spremika koji može iritirati oko pri nehotičnom kontaktu s površinom oka, što se češće događa starijim pacijentima. Zatim, pojedinim plastičnim spremnicima nedostaje elastičnost, odnosno teško se istiskuje sadržaj iz spremnika. Konačno, iako pri korištenju kapi za oko pakiranih u jednodozne spremnike teorijski ne postoji rizik kontaminacije, praksa je pokazala da pacijenti koriste isti jednodozni spremnik čak i kroz nekoliko dana, što ipak povećava rizik kontaminacije. Naime, jednodozno pakiranje uvijek sadrži suvišak oftalmičkog lijeka, a pojedini pacijenti imaju potrebu iskoristiti ukupan sadržaj jednodoznog spremnika kako se lijek ne bi bacao (15).

U RH su registrirana samo 4 oftalmička lijeka (jedan antibiotik i tri hipotenzivna lijeka) pakirana u jednodozne spremnike.



Slika 7. Primjer korištenja jednodoznog spremnika s *twist-off* čepom (25)



Slika 8. Primjeri jednodoznih spremnika s s *twist-off* čepom (51)

4.8.3. Višedozni spremnici oftalmičkih lijekova bez konzervansa

S ciljem izbjegavanja oftalmičkih nuspojava konzervansa i istodobnog zadržavanja sterilnosti oftalmičkog lijeka, za lijekove koji sadrže antibiotike ili alkaloide predloženo je pakiranje u višedozne spremnike bez konzervansa jer takvi lijekovi imaju intrinzičnu antimikrobnu učinkovitost. Za višedozne spremnike bez konzervansa se u starijoj literaturi navodi da je rok uporabe ograničen na 7 dana nakon otvaranja spremnika, pod uvjetom da se oftalmički lijek čuva na hladnom. Takav pristup ima određene nedostatke. Prvo, ograničen je na lijekove koji imaju intrinzičnu antimikrobnu učinkovitost, odnosno nije prikladan za umjetne suze. Drugo, primjena hladnih kapi za oko zahtijeva vrlo dobru suradljivost pacijenata. Međutim, starijim će pacijentima biti nelagodno primjenjivati hladne kapi u oko. Treće, čuvanje lijeka na hladnom nije apsolutna zaštita od kontaminacije (27).

U RH je odobren oftalmički lijek u višedoznom spremniku bez konzervansa, odnosno sadrži moksifloksacin, antibiotik IV. generacije fluorokinolona u spremniku od 5 ml te dodatno sadrži i boratnu kiselinu (Moksacin 5 mg/ml kapi za oko, otopina) (25).

4.8.4. Suvremeni višedozni spremnici kapi za oko

Zanimljiva alternativa za jednodozne spremnike je višedozni spremnik s posebnim filtrom. Postoje dvije varijante: (1) sterilna otopina lijeka bez konzervansa je zaštićena od mikrobiološke kontaminacije poroznim filtrom veličine pora 0,2 μm (bakterijska filtracija) i (2) konzervans je sadržan u otopini lijeka, ali se uklanja adsorpcijom na filtar pri primjeni. U oba se slučaja na oko primjenjuje otopina lijeka bez konzervansa (15). Cijena takvog suvremenog sustava pakiranja, iako veća od cijene klasičnih višedoznih spremnika, niža je od cijene jednodoznih spremnika. Nedostatak takvih spremnika je mogućnost bakterijske kolonizacije prostora između vrha i zatvarača spremnika (15).

ABAK (Laboratories Thea, Francuska) i COMOD (Ursapharm, Njemačka) su patentirani i komercijalizirani sustavi spremnika s beta-blokatorima (poput timolola, kartelola) i drugim djelatnim tvarima. ABAK je suvremeni spremnik u kojem se konzervans sadržan u oftalmičkoj otopini uklanja

filtracijom pri primjeni lijeka. COMOD je poseban sustav ventila ugrađenih u višedozni spremnik koji spriječavaju ulazak bakterija u otopinu lijeka. Prvi takav oftalmički lijek (Naabak) odobren je za primjenu u Francuskoj, a sadrži patentirani sustav ABAK (2).

Također, razvija se i sustav koji sadrži monolit integriran u vrat višedoznog spremnika s ciljem selektivnog odvajanja konzervansa pri primjeni lijeka. Na taj način se uklanjaju mogući štetni učinci konzervansa uz istodobno zadržanu mikrobiološku sigurnost otopine oftalmičkog lijeka u spremniku (52).

5. ZAKLJUČAK

Topikalni oftalmički pripravci sterilni su tekući, polučvrsti ili čvrsti farmaceutski oblici koji sadrže jednu ili više oftalmičkih djelatnih tvari i primjenjuju se u područje prednjeg segmenta oka (spojnica, rožnica ili donja konjunktivalna vrećica). Osim različitih djelatnih tvari, takvi pripravci sadrže i brojne pomoćne tvari koje su važne za prilagodbu toničnosti ili viskoznosti pripravka, za prilagodbu ili održavanje pH-vrijednosti, za povećanje topljivosti djelatne tvari ili povećanje fizičke, kemijske i/ili mikrobiološke stabilnosti pripravka. Oftalmičke pomoćne tvari ne smiju utjecati nepovoljno na sigurnosti primjene topikalnog oftalmičkog lijeka. Stoga je pri razvoju topikalnih oftalmičkih lijekova posebno važan sigurnosni profil sirovina koje ne smiju nepovoljno utjecati na stabilnost oftalmičkog lijeka, na njegov terapijski učinak i/ili izazivati lokalnu iritaciju površine oka.

Svaki oftalmički pripravak izrađuje se na način da se osigura sterilnost takvog pripravka u primarnom spremniku za vrijeme roka valjanosti pripravka. Oftalmički pripravci koji su namijenjeni za korištenje tijekom kirurških zahvata ili za primjenu na ozlijeđeno oko ne sadrže konzervanse zbog izražene mogućnosti nadražaja. Takvi pripravci najčešće se pakiraju u jednodozne spremnike. Ipak, topikalni oftalmički pripravci najčešće se pakiraju u višedozne spremnike i sadrže prikladan konzervans u odgovarajućoj koncentraciji, osim ako pripravak ima antimikrobna svojstva. Konzerviranje topikalnih oftalmičkih lijekova potrebno je radi sprječavanja sekundarne mikrobiološke kontaminacije lijeka pri primjeni. Mikroorganizmi se u pripravak mogu unijeti djelatnim i pomoćnim tvarima, ali češće izradom, neučinkovitom sterilizacijom i naknadnom (sekundarnom) kontaminacijom pripravka pri primjeni. Mikrobiološka kontaminacija oftalmičkog lijeka može uzrokovati ozbiljne infekcije oka ili značajno smanjiti djelotvornost oftalmičkog lijeka. Glavni kriteriji za izbor i određivanje udjela konzervansa u topikalnom oftalmičkom pripravku su: učinkovitost u što manjoj koncentraciji na širok spektar mikroorganizama, topljivost u formulaciji, kompatibilnost s drugim pomoćnim i djelatnim tvarima te materijalom spremnika i zatvarača, održavanje antimikrobne učinkovitosti s obzirom na pH-vrijednost farmaceutskog oblika unutar roka valjanosti. Osim antimikrobne učinkovitosti i odgovarajućih farmaceutsko-tehnoloških značajki, kriterij za izbor konzervansa trebao bi biti i štetnost za tkiva prednjeg segmenta oka. Konzervansi koji zadovoljavaju većinu takvih kriterija su kvaterni

amonijevi spojevi (primjerice, benzalkonijev klorid), parabeni, klorobutanol. U novije vrijeme koriste se suvremeni konzervansi; primjerice, natrijev perborat koji u vodenim otopinama prelazi u konzervans - vodikov peroksid koji se nakon primjene raspada na vodu i kisik; zatim stabilizirani okso-kloro-kompleks koji se raspada na natrijev klorid i vodu pri izlaganju svjetlosti zbog čega je pripravak konzerviran pri skladištenju, a bez konzervansa nakon primjene (OcuPure™, Purite®); te sofZia - ionski puferirajući sustav (smjesa boratne kiseline, propilenglikola, sorbitola i cinkovog klorida) koji djeluje kao oksidans.

Površinski aktivni konzervansi izravno oštećuju staničnu stijenku mikroorganizama pa su zbog takvog nespecifičnog mehanizma učinkoviti protiv širokog spektra mikroorganizama, ali istodobno mogu uzrokovati štetne učinke na stanicama površine oka. Oksidirajući konzervansi su male molekule s mogućnošću prolaza stanične stijenke mikroorganizama i oštećivanja njihovih unutarstaničnih enzimskih sustava. Takvi konzervansi su manje štetni za stanice površine oka, ali je njihova antimikrobna učinkovitost još uvijek predmetom brojnih ispitivanja. Alternativa konzerviranju oftalmičkih pripravaka je njihovo punjenje u jednodozne spremnike. Ipak, troškovi takve proizvodnje u velikoj mjeri povećavaju cijenu lijeka, a što u određenoj mjeri utječe na korištenje takvih lijekova. U današnje vrijeme razvojem suvremenih višedoznih spremnika moguće je izrađivati topikalne oftalmičke lijekove bez dodatka konzervansa, iako pojedina ispitivanja pokazuju mogućnost njihove sekundarne kontaminacije.

Najučinkovitiji i najviše korišten konzervans u oftalmičkim pripravcima je benzalkonijev klorid (BAK). Procjenjuje se da je približno 80% topikalnih oftalmičkih lijekova odobrenih za primjenu konzervirano BAK-om. BAK je smjesa alkildimetilbenzilamonijevih klorida različite duljine alkilnog lanca (od n-C8H17 do n-C16H33). Njegova antimikrobna učinkovitost uključuje bakterije, viruse i gljivice. Smatra se da su najučinkovitiji alkilni derivati duljine uglikovodičnog lanca od C12 do C14. BAK je kationska površinski aktivna tvar čija se antimikrobna učinkovitost smanjuje u smjesama s neionskim polioksietiliranim površinski aktivnin tvarima, odnosno potpuno se gubi pri koncentracijama većim od kritičnih micelizacijskih koncentracija takvih neionskih površinski aktivnih tvari. Smanjenje antimikrobne učinkovitosti opaženo je i za druge konzervanse (primjerice,

klorbutanol, klorheksidin, metilparaben, propilparaben) u smjesama s različitim neionskim površinski aktivnim tvarima.

Topikalni oftalmički lijekovi u određenoj mjeri uzrokuju toksične ili alergijske oftalmičke nuspojave, odnosno jatrogene bolesti oka. Toksične nuspojave rezultat su izravnog kemijskog nadražaja tkiva oka, dok alergijske nuspojave uključuju pokretanje imunosnim sustavom poredovane upalne procese u oku. Klinička ispitivanja pokazuju da topikalni oftalmički lijekovi uzrokuju različite nuspojave koje negativno utječu na suradljivost pacijenata i ishod liječenja. Takve nuspojave može uzrokovati bilo koja pomoćna (primjerice, konzervansi, površinski aktivne tvari) ili djelatna tvar sadržana u oftalmičkom lijeku. Uloga pojedinih tvari u oftalmičkom lijeku i njihov točan mehanizam uzrokovanja oftalmičkih nuspojava relativno su nejasni. Unatoč relativno dobrom sigurnosnom profilu, BAK ne može postići ciljani antimikrobni i antifungalni učinak bez uzrokovanja određenih oftalmičkih nuspojava. BAK može uzrokovati nestabilnost suznog filma, gubitak vrčastih stanica, pločastu metaplaziju stanica spojnice i apoptozu stanica rožnice, kao i oštećenje dubljih tkiva oka. Pri kratkotrajnom se liječenju najčešće ne opažaju vidljivi simptomi na oku, ali tijekom kronične primjene (primjerice, nekoliko godina) nuspojave postaju klinički prepoznatljive. S obzirom na činjenicu da je toksičnost konzervansa ovisna o vremenu i o dozi primjene kapi za oko, mogućnost oštećenja oka je osobito visoka kod pacijenata koji pate od kroničnih bolesti koje zahtijevaju svakodnevnu primjenu kapi za oko kroz duži vremenski period, odnosno nekoliko godina ili desetljeća (poput glaukoma i sindroma suhog oka). Pregledom dostupnih ispitivanja postoje dokazi da su oftalmičke nuspojave kapi za oko bez konzervansa znatno manje izražene u odnosu na primjenu konzerviranih kapi za oko stoga se može smatrati opravdanim korištenje kapi za oko bez BAK-a, posebno u pacijenata koji pate od popratnih bolesti površine oka.

Porast broja dokaza za toksičnost BAK-a i zahtjevi regulatornih tijela rezultirala su razvojem novih pristupa s ciljem prevladavanja štetnih oftalmičkih učinaka konzervansa. Razvijena je učinkovitija terapija glaukoma ili suvremene fiksne kombinacije lijekova s ciljem smanjenja doze konzervansa kojoj je izloženo oko pacijenata. Međutim, još uvijek postoji mogućnost kumulativnog učinka konzervansa tijekom dugog razdoblja primjene i razvoja klinički značajnih oftalmičkih nuspojava. Upotreba konzervansa može se izbjeći pakiranjem oftalmičkog lijeka u jednodozne spremnike. Iako

takav pristup može sigurno eliminirati izloženost oka konzervansu, istodobno se povećavaju troškovi proizvodnje takvih lijekova i njihov utjecaj na okoliš zbog značajnog povećanja otpadnog lijeka i ambalažnog materijala.

Osim alternativnih suvremenih konzervansa poput Purite, Sofzia i Polyquad čiji je dugoročni oftalmički učinak, potencijalne interakcije s djelatnim i/ili pomoćnim tvarima i antimikrobnu učinkovitost još potrebno dodatno potvrditi, redizajnom višedoznog spremnika kapi za oko razvijeni su oftalmički lijekovi bez konzervansa. Primjeri za takve inovativne višedozne spremnike su ABAK (Laboratoires Thea, Francuska) koji uvodi bakteriološki filtar na vrh višedoznog spremnika kojim se sprječava kontaminacija kapi za oko nakon otvaranja, odnosno pri primjeni, te COMOD (Ursapharm, Njemačka) višedozni spremnik koji dodatno sadrži poseban ventil za sprječavanje ulaska zraka u spremnik lijeka u svrhu izbjegavanja kontaminacije sadržaja spremnika lijeka. Premda su takvi suvremeni višedozni spremnici vrlo korisni i predstavljaju značajan iskorak u pakiranju kapi za oko, istodobno ne mogu zaštititi oftalmički lijek od kontaminacije uslijed pogreške u proizvodnom postupku.

6. LITERATURA

1. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2014.

2. Baudouin C, Lebbe A, Liang H, Paul A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. Progress in retinal and eye research 2010;29:312-334.

3. Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanja bioraspoloživosti lijeka u oku, Farmaceutski glasnik 2012;68.

4. Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči, Farmaceutski glasnik 2004;60:311–329.

5. Kaur I P, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. Drug Development and Industrial Pharmacy 2002;28:473-493.

6. Del Amo E M, Urtti A.Current and future ophthalmic drug delivery systems, A shift to the posterior segment. Drug Discovery Today 2008;13:135-143.

7. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacocinetics and drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2006;58:1131-1135.

8. Duvvuri S, Majumdar S, Mitra AK. Role of metabolism in ocular drug delivery. Current Drug Metabolism 2004;5:507-515.

9. Pepić I, Kaić N, Filipović-Grčić J. Nanočestice kao terapijski sustavi za primjenu lijeka u oko. Farmaceutski glasnik 2011;67:73-86.

10. Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophtalmic drug dosage forms: characterization and research methods. The Scientific World Journal, Volume 2014; 861-904.

11. Ali Y, Lehmussaari K. Industrial perspective in ocular drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2006;58:1258-1268.

12. Lang J C.. Ocular drug delivery conventional ocular formulations. Advanced Drug Delivery Reviews 1995;16:39-43.

13. Petriček, I. Utjecaj suznoga filma na vidnu funkciju. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu 2011.
Dostupno na poveznici: http://medlib.mef.hr/1380/1/Petricek_I_disertacija_rep_1380.pdf
Datum pristupa: 09.08.2016. godine.

14. Nagai N, Yoshioka C, Tanino T, Okamoto N, Shimomura Y. Decrease in corenal damage due to Benzalkonium chloride by the addition of manitol into timolol maleate eye drops. Journal of Oleo Science 2015; 64 (7): 743-750.

15. Furrer P, Mayer J M, Gurny R. Ocular tolerance of preservatives and alternatives. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2002; 53:263-280.

16. Epstein S P, Ahdoot M, Marcus E, Asbell P A. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2009; 25:113-119.

17. Pepić I. Novi sustavi za primjenu lijeka u oko. Farmaceutski glasnik 2004;60 (11):523-539.

18. Lee T W, Robinson J R. Ocular penetration enhancers. Ophthalmic Drug Delivery Systems, Second Edition 2003; 281–307.

19. Teuchner B, Wagner J, Bechrakis N E, Orth-Höller D, Nagl M. Microbial Contamination of Glaucoma Eyedrops Used by Patients Compared With Ocular Medications Used in the Hospital. Medicine (Baltimore) 2015; 94(8):583.

20. Jokl DH, Wormser GP, Nichols NS, et al. Bacterial contamination of ophthalmic solutions used in an extended care facility. British Journal of Ophthalmology 2007; 91:1308–1310.

21. Palioura S, Henry C R, Amescua G, and Alfonso E C. Role of steroids in the treatment of bacterial keratitis. Clinical Ophthalmology 2016;10:179–186.

22. Solanki S, Rathi M, Khanduja S, Dhull C S, Sachdeva S, Phogat J. Recent trends: Medical management of infectious keratitis. Oman Journal of Ophthalmology 2015;8(2):83-85.

23. Thomas P A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. Clinical Microbiology Reviews 2003;16(4):730–797.

24. Thomas P A. Fungal infections of the cornea. Eye (Lond) 2003;17(8):852–862.

25. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Baza lijekova, Dostupno na poveznici: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/ . Datum pristupa: 15.05.2016. godine.

26. Msd priručnik dijagnostike i terapije, Virusni konjuktivitis. Dostupno na poveznici: http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/oftalmologija/bolesti-spojnice-i-bjeloocnice/virusni-konjunktivitis. Datum pristupa 10.06.2016. godine.

27. Wilson L A. To preserve or not to preserve, is that the question? British Journal of Ophthalmology 1996;80:583-584.

28. Rosin L M, Bell N P. Preservative toxicity in glaucoma medication: clinical evaluation of benzalkonium chloride-free 0.5% timolol eye drops, Clinical Ophthalmology 2013;7:2131-2135.

29. Stalmans I, Sunaric Mégevand G, Cordeiro M F, Hommer A, Rossetti L, Goňi F, Heijl A, Bron A. Preservative-free treatment in glaucoma: who, when, and why? European Journal of Ophthamology 2013;23(4):518-525.

30. Charnock C. Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved ? Cornea 2006;25: 432 - 437.

31. Okahara A, Kawazu K. Local toxicity of benzalkonium chloride in ophthalmic solutions following repeated applications. The Journal of Toxicological Sciences 2013;38(4):531-537.

32. Amin A, Chauhan S, Dare M, Kumar Bansal A, Degradation of parabens by Pseudomaonas beteli and Burkholderia latens. European Juournal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2010;75:206-212.

33. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Postupak davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet, Dostupno na: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Informacije-o-lijekovima/Postupak-odobravanja-lijeka/ Datum pristupa 17.08.2016. godine.

34. Zakon o lijekovima (Narodne novine, br. 76/13. i 90/14.).

35. Pravilnik o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet (Narodne novine, br. 83/13.).

36. Tressler C S, Beatty R, Lemp M A. Preservative use in topical glaucoma medications.The Ocular Surface 2011;140-158.

37. Chan Hew Wai A, Becasse P, Tworski S, Pradeau D, Planas V. Optimising concentrations of antimicrobial agents in pharmaceutical preparations: Case of an oral solution of glycerol and an ophthalmic solution containing cysteamine. Annales Pharmaceutiques Françaises 2014;72: 415-421.

38. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2008;60:1663-1673.

39. Zakon o zaštiti životinja (Narodne novine, br. 135/06., 37/13. i 125/13).

40. 2007 Report of the Dry Eye Workshop (DEWS). The Ocular Surface 2007;5(2):75-92

41. Rolando W, Brezzo V, Giordano G, Campagna P, Burlando S, Calabria G, The effect of different benzalkonium chloride concentrations on human normal ocular surface. In: Van Bijsterveld, O., lemp, M., Spinelli, D., (Eds.); Symposium on the lacrimal system: Singapore, March 1990. Amsterdam, Kugler & Ghedini, 1991:87–91.

42. Tripathi B J, Tripathi R C, Kolli S P. Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. Lens and Eye Toxicity Research 1992;9(3-4):361-75.

43. Uematsu M, Kumagami T, Shimoda K, et al. Influence of alkyl chain lenght of benzalkonium chloride on acute corneal epithelial toxicity. Cornea 2010; 29:1296-301.

44. Chapman J M, Cheeks L, Green K. Interactions of benzalkonium chloride with soft and hard contact lenses. Archives of Ophthalmology 1990;108(2):244.

45. Nebbioso M, Evangelista M, Plateroti A M. Iatrogenic dry eye disease: An eledoisin/carnitine and osmolyte drops study. Biomedicine and Pharmacology 2013; 67:659-663.

46. Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A & Zeyen T.Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. European Journal of Ophthalmology 2007;17: 341–349.

47. Codling C E, Maillard JY, Russell A D. Aspects of the antimicrobial mechanisms of action of a polyquaternium and an amidoamine. Oxford Journals, Medicine & Health, Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2003; 51(5):1153-1158.

48. Bennett E S, Weissman B A. Clinical Contact Lens Practice. Lippincott Williams & Wilkins 2005, str.388-390.

49. Copeland R A Jr, Afshari N A. Copeland and Afshari's Principles and Practice of Cornea. , Jajyee Highlights Medical Publishers Inc. 2013;1(6): str.478.

50. Ghelardi E, Celandroni F, Gueye S A, Salvetti S, Campa M, Senesi S. Antimicrobial activity of a new preservative for multiuse ophthalmic solutions. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2013; 9 (6):586-590.

51. Weiler Engineering, Inc. Dostupno na: http://www.weilerengineering.com/b-f-s-applications/eye-care-ophthalmics, datum pristupa 20.08.2016. godine

52. Hsu K H, Chauhan A. Rapid and selective removal of preservative from ophthalmic formulations during eyedrops instillation, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2015;97:30-38.

KRATICE

BAK	Benzalkonijev klorid
BCS	Biofarmaceutski sustav klasifikacije djelatnih tvari
CFU	Colony forming units
CMC	Kritična micelizacijska koncentracija
CTD	Zajednički tehnički dokument
DCP	Decentralizirani postupak odobravanja lijekova (Decentralized Procedure)
EDTA	Dinatrijev etilendiamintetraacetat
HALMED	Agencija za lijekove i medicinske proizvode
HEC	Hidrosietilceluloza
HPMC	Hidroksipropil metilceluloza
HCE-T	Stanična linija epitelnih stanica rožnice
MRP	Postupak međusobnog priznavanja (Mutual recognition procedure)
Ph.Eur.	Europska farmakopeja
PCR	Metoda lančane reakcije polimeraze
SAD	Sjedinjene američke države
SHMG	Natrijev (hidroksimetil)glicinat
USP/NP	Američka farmakopeja