Ispitivanje kriozaštitnog učinka komercijalno dostupnih medija za pohranu rožnica

Stjepanović, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:824421

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Josipa Stjepanović

Ispitivanje kriozaštitnog učinka komercijalno dostupnih medija za pohranu rožnica

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Pepiću na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, savjetima i uloženom vremenu. Također se zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju, a posebno magistri Katarini Antolić na velikoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Hvala svima koji su mi studentske dane učinili prekrasnim, a posebno mojim Mirovcima i MP-ovcima, nerazdvojnoj ekipi s Cvjetnog- Andrei, Maji, Meši i Anamariji, najboljoj grupi V7, Klari na predivnoj podršci i Dominiku na bezuvjetnoj ljubavi i strpljenju.

I na kraju, hvala dragom Bogu koji mi je darovao prekrasnu obitelj kojoj posvećujem ovaj rad. Mama, tata, Marta, ovo je vaše koliko i moje.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GRAĐA I FUNKCIJA ROŽNICE 2

1.2. STANDARDNE TEHNIKE POHRANE ROŽNICA 4

1.3. OSNOVNA NAČELA KRIOPOHRANE ROŽNICA 6

1.4. MEDIJI ZA POHRANU ROŽNICA 7

1.4.1. Mediji CorneaMax® i CorneaJet® 7

1.4.2. Ispitivanja učinkovitosti, sigurnosti i kvalitete medija za pohranu 8

1.5. RAZVOJ *IN VITRO* I *EX VIVO* METODA U SVRHU PRETKLINIČKIH ISPITIVANJA 10

2. OBRAZLOŽENJE TEME 12

3. MATERIJALI I METODE 14

3.1. MATERIJALI 15

3.2. PRIPRAVA KREBS-RINGEROVOG PUFERA 15

3.3. PRIKUPLJANJE I IZOLIRANJE ANIMALNIH ROŽNICA 15

3.4. KRIOZAŠTITA ANIMALNIH ROŽNICA 16

3.5. PROTOKOLI ZAMRZAVANJA I ODMRZAVANJA ROŽNICA 17

3.5.1. Protokol 1 17

3.5.2. Protokol 2 17

3.5.3. Protokol 3 17

3.6. ODREĐIVANJE TEER-A ROŽNICA 18

4. REZULTATI I RASPRAVA 19

4.1. PROCJENA BARIJERNIH ZNAČAJKI ROŽNICA NAKON RAZLIČITIH PROTOKOLA ZAMRZAVANJA-ODMRZAVANJA S CORNEAMAX® MEDIJEM KAO KRIOZAŠTITNIM SREDSTVOM 20

4.2. PROCJENA BARIJERNIH ZNAČAJKI ROŽNICA NAKON RAZLIČITIH PROTOKOLA ZAMRZAVANJA-ODMRZAVANJA S CORNEAJET® MEDIJEM KAO KRIOZAŠTITNIM SREDSTVOM 23

5. ZAKLJUČCI 27

6. LITERATURA 29

7. SAŽETAK/ SUMMARY 33

1. UVOD

1.1. Građa i funkcija rožnice

Rožnica je avaskularno, transparentno, kupolasto tkivo koje ima dvostruku ulogu unutar oka; lomi svjetlost preko zjenice do leće te stvara zaštitnu, nepropusnu barijeru za mehanička oštećenja i infektivne agense. Ona je najsnažnija leća oka, a refrakcijska moć joj iznosi približno +43 dioptrije. Glavna funkcija rožnice je omogućavanje prolaska svjetlosti do unutarnjeg dijela oka. Prosječna veličina ljudske rožnice je 11-12 mm horizontalnog promjera te 9-11 mm vertikalnog promjera. Debljina iznosi približno 0,5 mm, ali se postupno povećava prema periferiji. Rožnica je sastavljena od šest slojeva: epitela i bazalne membrane, Bowmannovog sloja, strome, Descemetove membrane i endotela (Jirsova, 2017). Uz tri glavna tipa stanica, epitelne stanice, stromalne keratocite i endotelne stanice (Reichl i sur., 2004), rožnica sadrži heterogenu populaciju dodatnih stanica koje su uključene u homeostazu (Jirsova, 2017).

Epitel rožnice, debljine oko 50 μm, sastoji se od četiri do šest slojeva nekeratiniziranih, stratificiranih, skvamoznih epitelnih stanica (Eghrari i sur., 2015). Ispod dva do tri reda plosnatih, poligonalnih stanica te dva do tri reda krilastih stanica, nalazi se jedan sloj bazalnih stanica koji prianja uz bazalnu membranu. Jedino bazalne stanice posjeduju proliferativni kapacitet; one diferenciraju u krilaste stanice koje potom odlaze do površine i diferenciraju u površinske, plosnate stanice (Jirsova, 2017). Epitelne stanice se podvrgavaju apoptozi i deskvamaciji, a obnavljaju se diobom matičnih stanica u limbusu, doprinoseći tako kretanju epitelnih stanica u apikalnom smjeru (Eghrari i sur., 2015). Prosječan životni vijek im je od 7 do 10 dana (DelMonte i Kim, 2011), a prosječna izmjena epitela približno je jedan sloj stanica dnevno (Pepić i sur., 2012). Epitel je prekriven suznim filmom koji štiti površinu oka od dehidracije, osigurava glatkoću, pomaže u opskrbi rožnice kisikom i nutrijentima te služi u obrani od bakterija, virusa i toksina (Jirsova, 2017), a apikalni mikrovili i mikronabori te nabijeni glikokaliks, s kojima su prekriveni prvi redovi stanica epitela, povećavaju površinu suznog filma. Na periferiji, čvrste međustanične veze (engl. *tight junction*) osiguravaju vodonepropusne spojeve te pomažu u prevenciji ulaska patogenih organizama u rožnicu i inhibiraju ulazak patogena u stromu (Eghrari i sur., 2015). Oštećena površina rožnice čini ju podložnom infekcijama opasnim za vid, neovaskularizaciji, oštećenjima i slabljenju s rizikom stvaranja perforacija i gubitka oka. Obnavljanje epitela rožnice nakon ozljede odvija se u tri faze: migracija susjednih, netaknutih epitelnih stanica kako bi prekrile oštećeno područje, proliferacija monosloja migriranih stanica kako bi se obnovila debljina epitela te

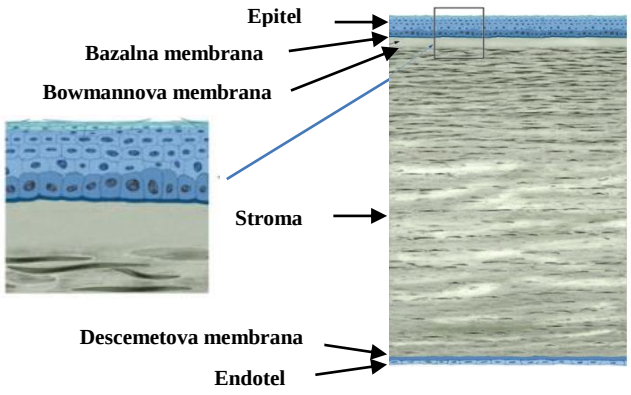
diferencijacija obnovljenog epitela u svrhu ponovne uspostave strukture i funkcije (Chow i Di Girolamo, 2014).

Bowmannova membrana je acelularni sloj kolagenskih vlakana, debljine oko 15 µm. Nalazi se ispred strome rožnice (DelMonte i Kim, 2011), a stvaraju ju stromalni keratociti. Većinom se sastoji od izvanstaničnog matriksa, ponajviše proteoglikana i kolagena tipa I, III, V i VII. Funkcija Bowmannove membrane nije u potpunosti poznata, ali smatra se da služi kao barijera koja štiti stromu od teških ozljeda. S godinama joj se smanjuje debljina što se može objasniti prirodnim, postupnim umrežavanjem kolagena ili njegovom degradacijom. Prodiranjem u Bowmannovu membranu, stromalni kolageni fibrili povećavaju čvrstoću i stabiliziraju oblik vanjskog dijela rožnice (Jirsova, 2017).

Stroma je najsnažniji sloj rožnice i zauzima oko 90% debljine rožnice. Primarno se sastoji od izvanstaničnog matriksa; do 15% volumena strome čine stromalne stanice te keratociti. Najvažnija strukturna komponenta je kolagen koji čini 71% suhe tvari rožnice (Jirsova, 2017), a njegova visokoorganizirana mreža pridonosi transparentnosti i mehaničkoj čvrstoći rožnice (DelMonte i Kim, 2011).

Descemetova membrana je bazalna membrana kornealnog endotela, a debljina iznosi približno 3 µm u djece; ona se postupno povećava te kod odraslih iznosi do 10 µm (Eghrari i sur., 2015). Podijeljena je u dva morfološki različita dijela: prednji povezani sloj, debljine 3 µm, koji se stvara tijekom fetalnog razvoja te homogeni nepovezani sloj koji se stvara tijekom života, a čija debljina doseže 8 do 10 µm (Jirsova, 2017).

Kornealni endotel sastavljen je od jednog sloja ravnih, poligonalnih stanica (Eghrari i sur., 2015), ali predstavlja vrlo otpornu i elastičnu membranu (Pepić, 2004). Glavna zadaća endotela je održavanje adekvatne hidracije rožnice što osigurava njenu transparentnost. Kornealni endotel je metabolički najaktivniji sloj rožnice, ali i najosjetljivi na potencijalno oštećenje (Jirsova, 2017).

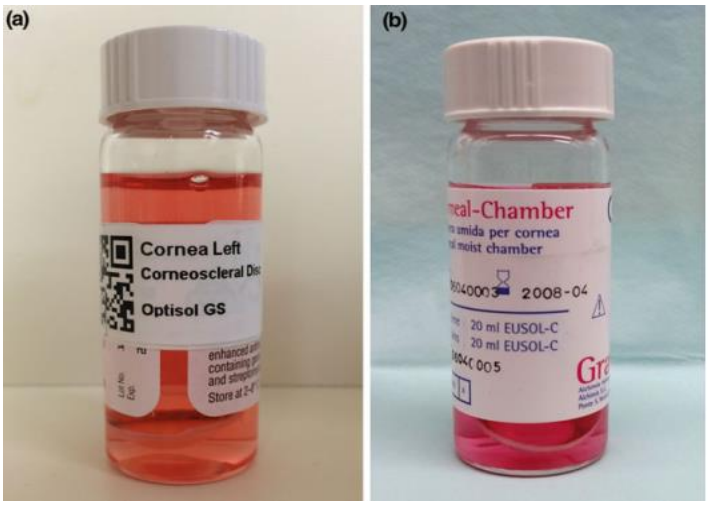


Slika 1. Poprečni presjek ljudske rožnice
(prilagođeno prema Jirsova, 2017)

1.2. Standardne tehnike pohrane rožnica

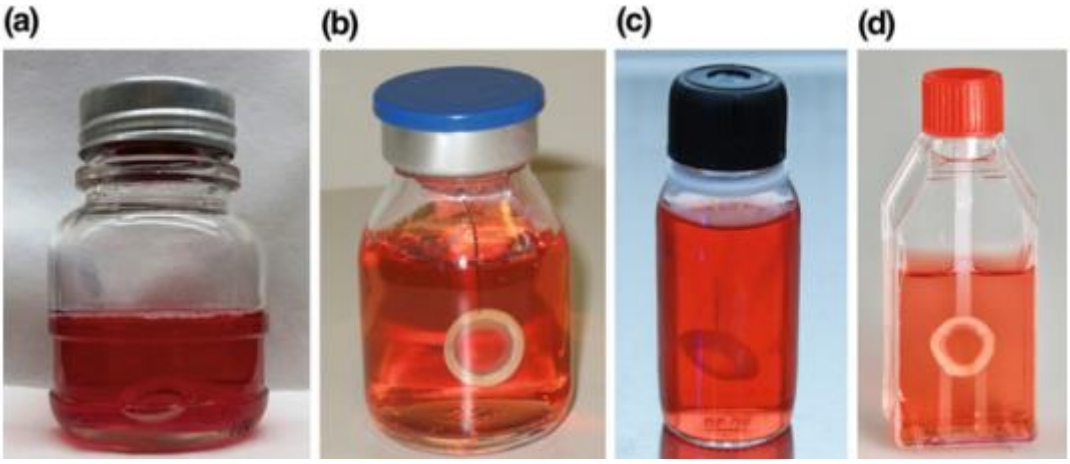
Glavni kriterij uspješnog ishoda transplantacija rožnica, usko povezan sa transparentnošću transplantata, je stanje endotelnih stanica koje prekrivaju unutarnju površinu rožnice (Schmid i sur., 2018). Budući da ljudske, kornealne, endotelne stanice ne proliferiraju brzo (Armitage, 2011), a tijekom pohrane se ireverzibilno mijenjaju i značajno gube (Guindolet i sur., 2017), pohrana endotela primarni je cilj svih tehnika pohrane. Postoje tri glavna pristupa u očuvanju i pohrani rožnica: kultura tkiva, hipotermija i kriopohrana. Trenutno, jedino zadnja metoda pruža mogućnost pohrane na dugo razdoblje, no zbog složenosti te potencijalnog oštećenja endotela, kriopohrana se rutinski rijetko koristi u očnim bankama (Armitage, 2011). Iz navedenih razloga, kratkotrajna pohrana (hipotermija i kultura tkiva) je trenutno jedina prihvatljiva metoda očuvanja i zaštite rožnica u očnim bankama (Schönfelder i sur., 2014).

Jednostavnost procesa i neposredna dostupnost tkiva za transplantaciju čine hipotermiju najčešće korištenom metodom u Sjevernoj Americi (Jirsova, 2017; Armitage, 2011). Za pohranu u hipotermnim uvjetima (2-8 °C) preporučuje se maksimalno razdoblje od 14 dana, iako je dokazano da pohrana dulja od 7 dana može povećati primarni neuspjeh. Glavni cilj hipotermne pohrane je korištenje niskih temperatura kako bi se potisnula metabolička aktivnost, inhibirali stanični procesi te smanjila potreba za energijom u tkivima i time sačuvalo prvobitno stanje rožnice. Od komercijalno dostupnih medija za hipotermnu pohranu, Optisol-GS (Bausch and Lomb, Rochester, NY) se trenutno najčešće koristi u SAD-u, dok je Eusol-C (Alchimia, Srl, Padova, Italija) prvi izbor u Europi (Jirsova, 2017).



Slika 2. Rožnice pohranjene u hipotermnim uvjetima
(a) Rožnica pohranjena u Optisol-GS (b) Rožnica pohranjena u Eusol-C
(prilagođeno prema Jirsova, 2017)

S druge strane, kultura tkiva se kao metoda pohrane rožnica koristi u oko 65% očnih banaka u Europi zbog mogućnosti detaljne procjene endotela rožnica te produljenja pohrane na razdoblje od 4 do 5 tjedana. Rožnice se obično održavaju u biološkom inkubatoru pri 30-37° C, u većini očnih banaka pri 31°C. Širok raspon temperatura koji se koristi pri pohrani rožnica ukazuje na činjenicu da temperatura nije ključna varijabla, ali ne bi trebala biti preniska ili previsoka. Najčešće korišten medij je Eagle Earls minimalni esencijalni medij (MEM) dopunjen fetalnim goveđim serumom, antibioticima (najčešće korišteni su penicilin, streptomicin i gentamicin) i antimikoticima (najčešće amfotericin B). Od ostalih komercijalno dostupnih medija, Tissue-C (Alchimia) i CorneaMax (Eurobio, Les Ulis, France) se koriste u bankama članicama EEBA (Jirsova, 2017).



Slika 3. Rožnice pohranjene u kulturi tkiva
(a) Rožnica slobodno položena na dno s endotelnom stranom usmjerenom prema gore
Rožnica pluta u mediju ovješena na konac (b) ili plastični držač (c)
(d) Rožnica učvršćena za plastični držač (prilagođeno prema Jirsova, 2017)

Međutim, koristeći kratkotrajno pohranjene rožnice, dobivaju se rezultati koji se uvelike razlikuju, a očuvane rožnice imaju neprihvatljivo veliki gubitak epitela u usporedbi s nativnim tkivom. Epitelni defekti se, s vremenom, javljaju u gotovo svim pohranjenim rožnicama (Soni i sur., 2015), no ako je u procesu transplantacije prisutan funkcionalan limbus u rožnici primatelja, nije potreban potpuno očuvan kornealni epitel. S obzirom da se epitelne stanice vrlo brzo obnavljaju u limbalnom području (Jirsova, 2017), epitel ima manju ulogu tijekom transplantacije i ne predstavlja veliku brigu očnim bankama (Guindolet i sur., 2017), no još nije istraženo imaju li mrtve, epitelne stanice potencijalno negativan učinak na preživljavanje endotelnih stanica (Valtink i sur., 2016). Ipak, budući da epitel doprinosi približno 80% ukupnih barijernih svojstava rožnice, ovakve standarne tehnike očuvanja rožnica ne mogu biti

korištene u svrhu pretkliničkih, oftamoloških, farmaceutskih odnosno kozmetičkih i biomedicinskih istraživanja. Istraživanje i razvoj *in vitro/ex vivo* testova koji bi zamijenili testiranja na životinjama za oftamološka, pretklinička ispitivanja i biomedicinska istraživanja predstavljaju veliki izazov.

1.3. Osnovna načela kriopohrane rožnica

Rožnica je višestanično tkivo koje sadrži višeslojni epitel, monosloj endotelnih stanica i keratocite, odnosno stromalne fibroblaste rožnice. Na temelju toga, rožnica je, ne samo strukturno, nego i funkcionalno znatno složenija od pojedinačnih stanica (Pepić i sur., 2014). Takva složenost odražava se u zahtjevima za odgovarajuću kriozaštitu. Originalno razvijene za dugotrajnu pohranu izoliranih stanica, tehnike za kriozaštitu tkiva dovode se u pitanje postojanjem raznih tipova stanica s različitim zahtjevima za optimalno čuvanje. Budući da se pri temperaturama ispod ništice stvore prevelika oštećenja, kriopohranu nije moguće uspješno provesti na svježe izoliranim rožnicama. Upravo zbog toga, ali i zbog rizika gubitka endotelnih stanica kojeg mogu izazvati postupci zamrzavanja i odmrzavanja, kriopohrana nije postigla široko prihvaćanje, osobito u postupku tranplantacije u kojem se najčešće koristi kratkotrajna pohrana. U idealnim uvjetima, kriopohrana bi trebala sačuvati funkcionalna svojstva rožnice kako bi dobiveni rezultati mogli biti usporedivi s kontrolom, odnosno svježim rožnicama. Ključna prednost kriozaštite je pohrana na vrlo niskim temperaturama ispod 0°C, uz mogućnost očuvanja struktuno intaktnog, živog tkiva rožnice na relativno dugo razdoblje. Primjereno kriozaštićene rožnice mogu poslužiti kao vrijedan alat za razna pretklinička istraživanja.

Dobivanje odgovarajućih i ponovljivih rezultata pri kriopohrani rožnica zahtijeva razumijevanje i optimizaciju glavnih varijabla koje su uključene u obradu i zaštitu rožnice kao što su sastav medija unutar kojeg se uzorci zamrzavaju, kompozicija složene otopine (engl. *vehicle solution*), brzina zamrzavanja, temperatura pohrane te brzina odmrzavanja. Uspjeh je definiran kao visoka stopa oporavka staničnih struktura i izvanstaničnih komponenti rožnice nakon odmrzavanja. Povrh toga, budući da je rožnica jedno od najosjetljivijih tkiva u tijelu, naročito kada se radi o oštećenjima vezanim uz kriopohranu, razvoj prikladne tehnike kriopohrane rožnice će imati važnost u usavršavanju zaštite i očuvanja ostalih tkiva u ljudskom tijelu pri niskim temperaturama (primjerice krvne žile, srčani zalisci i tkivo ovarija).

Presudni čimbenik za uspješnu kriopohranu rožnice je prevencija stvaranja kristala leda: formiranje leda u tkivima je najkritičniji faktor koji određuje u kojoj mjeri tkiva mogu

preživjeti postupke kriopohrane uključujući zamrzavanje i odmrzavanje. Stvaranje leda uzrokuje smrt stanica te oštećenje izvanstaničnog matriksa rožnice. Tijekom hlađenja na vrlo niske temperature, voda istječe iz stanice te se stanica smanjuje. Izvan stanice, nukleacija leda se pokreće pri oko 5°C. Ako se zamrzavanje provodi brzo, mali kristali leda se stvaraju unutar stanice; takvi mali kristali se sjedinjuju, stvaraju veće te oštećuju staničnu membranu tijekom otapanja. Ako se zamrzavanje odvija polagano, kristali leda se stvaraju izvan stanice, okolina postaje hiperosmotska te se stanice oštećuju. Uz stvaranje leda, ostali čimbenici koji utječu na kriopohranu rožnice su oni koji tijekom zamrzavanja mogu imati biološke posljedice. To su inhibitorni učinci niskih temperatura na kemijske i fizikalne procese, te možda još važniji, fizikalno-kemijski učinci rastućih koncentracija otopljenih tvari budući da volumen vode opada tijekom kristalizacije. Takav proces rezultira smanjenjem volumena stanice te rizikom taloženja otopljenih tvari.

Većina stanica ne može preživjeti zamrzavanje i odmrzavanje ukoliko nije korišten krioprotektor. Oni su djelotvorni za oštećenja nastala sporim zamrzavanjem, no ne štite stanice od oštećenja koja stvara led unutar njih. Prema tome, povećanjem početne koncentracije krioprotektora, povećava se preživljavanje stanica te se optimalna brzina hlađenja pomiče na niže vrijednosti (Bredehorn-Mayr i sur., 2009).

1.4. Mediji za pohranu rožnica

1.4.1. Mediji CorneaMax® i CorneaJet®

Transplantacija rožnice obično se provodi u tri faze, a Eurobio laboratoriji nude tri vrste medija, svaki posebno odgovarajući za jednu od faza: CorneaPrepII® za uzorkovanje i transport, CorneaMax® za pohranu te CorneaJet® za odbubrivanje i prijenos transplantata (www.eurobio-cornea.com).

Nakon ekscizije rožnice *in situ*, transplantat se prenosi u transportni medij CorneaPrepII®. Nakon toga, transplantat se premješta u CorneaMax®, medij za pohranu u kojem su rožnice pohranjene 30 dana pri 31°C (Parekh i sur., 2015). Pohrana rožnice u CorneaMax® mediju dovodi do povratnog zamućenja rožnice. Nakon analize transplantata i odabira primatelja, rožnica se pohranjuje u CorneaJet®, medij za odbubrivanje i konačni transport. Rožnica se u tom mediju čuva barem 24 sata kako bi se osigurala transparentnost (www.eurobio-cornea.com).

Iako im se uloge u pohrani rožnica razlikuju, mediji CorneaMax® i CorneaJet® koji su korišteni u ovom diplomskom radu, imaju vrlo sličan sastav. To su mediji za kulturu tkiva

koji sadrže esencijalne i neesencijalne aminokiseline, vitamine i elektrolite, australijski ozračeni fetalni teleći serum, penicilin (streptomicin), HEPES pufer i bikarbonate. Dekstran je jedina sastavnica po kojoj se mediji razlikuju; on je glavna komponenta CorneaJet® medija, odgovorna za svojstvo odbubrivanja (www.eurobio-cornea.com). Dekstran je najčešća sastavnica medija za odbubrivanje korištena u postupcima kratkotrajne pohrane rožnica (Parekh i sur., 2015) jer kontrolira stromalnu hidraciju (Jirsova, 2017.), smanjuje debljinu rožnice i vraća ju u oblik pogodan za transplantaciju (Parekh i sur., 2015). No budući da je poznato da dekstran može uzrokovati promjene pri duljim razdobljima pohrane kao što je gubitak endotelnih stanica donorskih rožnica (Smith i sur., 2012; Borderie i sur., 1997; Redbrake i sur., 1997), istražuju se različite tvari koje bi mogle biti njegova potencijalna zamjena. U tu svrhu dokazano je da se unutar 5 dana pohrane u mediju za odbubrivanje koji sadrži HES ne nanosi šteta endotelnim stanicama (osim u MEM mediju), ali se epitelne stanice oštećuju (Valtink i sur., 2016). Poloksamini se na animalnom modelu pokazuju kao dobri kandidati za zamjenu dekstrana, no potrebne su dodatne studije efikasnosti i učinkovitosti na ljudskim rožnicama (Zhao i sur., 2012), dok poloksameri također pokazuju dobra svojstva odbubrivanja, ali ne tako dobra kao dekstran (Parekh i sur., 2015).

Mediji iz Cornea linije isporučuju se kao smrznuti proizvodi u izotermnom pakiranju koje sadrži suhi led, a proces odmrzavanja treba ići postupno: pri 4°C, a zatim pri sobnoj temperaturi ili u vodenoj kupelji pri 37°C (www.eurobio-cornea.com). Iako je naznačeno da se odmrznuti mediji ne bi trebali ponovno zamrzavati, u ovom diplomskom radu svjesno se tome pristupilo sa svrhom dobivanja novih rezultata i opažanja ponašanja medija i rožnice tijekom kriopohrane**.**

1.4.2. Ispitivanja učinkovitosti, sigurnosti i kvalitete medija za pohranu

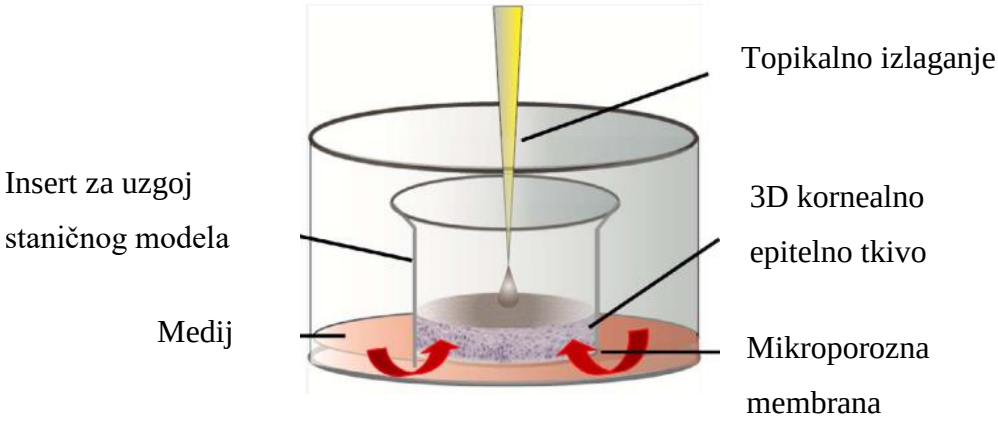
In vitro metode, razvijene kao metode kratkotrajne pohrane rožnica (opisane u dijelu 1.3.), pokazuju nedostatke koji imaju veliki utjecaj na transplantaciju. Tijekom pohrane u postupku kulture tkiva, gustoća endotelnih stanica može se značajno smanjiti, a sposobnost regeneracije endotelnih stanica je vrlo niska. Kao posljedica toga, 20% donorskih rožnica nije odgovarajuće za transplantaciju. Sprječavanje ili smanjenje opadanja gustoće endotelnih stanica tijekom kulture tkiva jedan je od glavnih izazova očnih banaka. Stoga je neophodno održavati visoku kvalitetu korištenih materijala, uređaja za pohranu te posebno medija za pohranu rožnica koji bi se trebao prilagođavati nutritivnim potrebama rožnice, a ponajviše potrebama endotelnih stanica. Zbog toga, procjena kvalitete medija posljednjih godina ulazi u središte istraživanja (Schönfelder i sur., 2014) te se objavljuju brojne studije koje istražuju

kvalitetu i učinkovitost medija za pohranu. Različiti sastavi medija su komercijalno dostupni**;** mediji koji sadrže fetalni goveđi serum u koncentraciji 2-8%, dok su s druge strane dostupni mediji koji ne sadrže serum. Uloga fetalnog goveđeg seruma još nije poznata, ali je zabilježeno da pomaže stanicama u pružanju otpora stresu u *in vitro* uvjetima, a u odsustvu je zabilježen velik gubitak stanica svinjskih rožnica (Parekh i sur., 2018). Mediji koji se koriste u kulturi tkiva obično sadrže serum, no budući da sastavnice animalnog podrijetla potencijalno mogu uvesti životinjske viruse ili prione koji se mogu asimilirati u ljudskom tijelu, takvi mediji mogu biti opasni (Parekh i sur., 2015). Zbog tog razloga, kao i zbog varijabilnosti različitih serija seruma, razvijaju se sintetski mediji, a rHSA (rekombinantni humani serumski albumin) se testira kao potencijalna zamjena (Parekh i sur., 2018). Iako neka istraživanja pokazuju veću ukupnu kvalitetu medija koji sadrži serum (Parekh i sur., 2015), novija saznanja daju prednost korištenju medija bez seruma (Valtink i sur., 2016) te je dokazan bolji zaštitni učinak novog, u potpunosti sintetskog medija koji sadrži rHSA umjesto seruma - medij CorneaSyn®. Uspoređujući s rožnicama pohranjenim u mediju CorneaMax®, rožnice pohranjene u sintetskom mediju CorneaSyn® pokazuju višu i statistički značajnu vrijednost **s** obzirom na gustoću endotelnih stanica, smrtnost, morfologiju i unos glukoze u razdoblju poslije pohrane, a histološki nalaz potvrđuje postojanje svih slojeva (Parekh i sur., 2018).

Veliki problem kratkotrajne pohrane u hipotermnim uvjetima u mediju Optisol-GS predstavlja stalan porast morbiditeta poput gljivičnih infekcija i endoftalmitisa nakon keratoplastike (Duncan i sur., 2016). Iako medij Optisol-GS sadrži antibakterijske dodatke (Layer i sur., 2014), antimikrobna sposobnost se smanjuje pri 6°C, temperaturi hipotermne pohrane (Kapur i sur., 2006). Nadalje, smatra se da veliku ulogu u pojavnosti gljivičnih oboljenja ima odsustvo antifungalnih dodataka. Dodatkom amfotericina B u *in vitro* uvjetima, Optisol-GS medij pokazuje značajno veću otpornost prema gljivicama vrste *Candida*, primarnom uzroku gljivičnih endoftalmitisa nakon transplantacije rožnice. Pri maksimalnoj koncentraciji amfotericina B u mediju, stvaraju se značajni, toksični učinci na endotel (Layer i sur., 2014), no pri nižim koncentracijama nema dokaza za toksično djelovanje medija na rožnice (Duncan i sur., 2016; Layer i sur., 2014). Prema aktualnom izvještaju medicinskog savjetodavnog odbora EBAA, ne preporučuju se antifungalni dodaci u medije za pohranu rožnica zbog nedovoljno dokaza u odnosu na učinkovitost i sigurnost (Layer i sur., 2014).

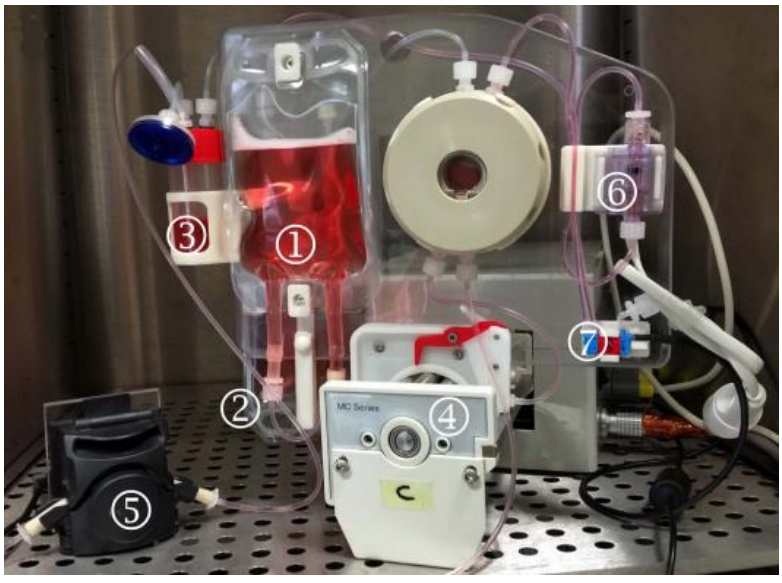
1.5. Razvoj *in vitro* i *ex vivo* metoda u svrhu pretkliničkih ispitivanja

Povećanjem broja ljudi s oštećenjima vida te sve raširenijom upotrebom oftalmičkih lijekova posljednjih godina, dolazi do povećane potrebe za apsorpcijskim analizama tijekom razvoja i karakterizacije novih ljekovitih supstancija i formulacija. Jedan od glavnih problema oftalmičkih lijekova je bioraspoloživost koja u pravilu iznosi ispod 5% za topikalno primijenjene lijekove. Nisku bioraspoloživost uzrokuju mnogi faktori (Kaluzhny i sur., 2018), a ona je posljedica nepermeabilnosti epitelne membrane rožnice, nazolakrimalne drenaže, dinamike suza te visoke učinkovitosti krvno-očne barijere (Pepić, 2004). U otkriću, razvoju i odabiru novih oftalmičkih lijekova i terapijskih sustava važnu ulogu imaju *in vitro* studije permeacije. Kako bi se izbjegli pokusi na životinjama koji imaju razne nedostatke kao što su interindividualne razlike u permeabilnosti, visoki troškovi laboratorijskih životinja te njihov veliki broj, razvijaju se standardizirani *in vitro* test sustavi temeljeni na metodama stanične kulture (Reichl i sur., 2004). Tako je razvijen fiziološki relevantan, trodimenzionalni, kornealni, epitelni tkivni model kojemu je barijera dobro razvijena te je usporediva sa strukturom epitela ljudske rožnice. Sadrži čvrste međustanične veze i dezmosome te donosi vrijednosti TEER-a iznad 1000 Ω × cm². Uporaba takvog tkivnog modela bi mogla pojednostaviti optimizaciju oftalmičkih lijekova jer izbjegava ekstrapolaciju podataka između vrsta, a pruža informacije vezane uz metabolizam i permeabilnost lijekova, toksičnost i utjecaje na integritet barijere (Kaluzhny i sur., 2018).



Slika 4. Shematski prikaz 3D kornealnog tkivnog modela koji raste u kulturi stanica (prilagođeno prema Kaluzhny i sur., 2018)

Model koji bi također mogao naći mjesto u pretkliničkim ispitivanjima permeabilnosti lijekova je inovativni bioreaktor koji stvara gradijent transkornealnog tlaka ekvivalentan intraokularnom tlaku, a putem kojeg dolazi do konstantne obnove medija. Bioreaktor, napravljen od biokompatibilnog materijala, sadrži endotelne i epitelne ćelije, a čvrsto postavljena svinjska rožnica razdvaja ćelije. Pomoću peristaltičke pumpe održava se protok medija (5µL/min) i tlak (20 mmHg) unutar endotelne ćelije, a cijeli sustav smješten je u CO_2 inkubator pri 31°C. Površina rožnice izlaže se zraku i specifičnom mediju u epitelnoj ćeliji, a kroz dva transparentna prozora omogućeno je mjerenje debljine rožnice. Veličine koje se određuju su struktura i diferencijacija epitela i limbusa, transparentnost i debljina rožnice te endotelna vijabilnost između svježih rožnica i rožnica nakon 7 dana pohrane u opisanom bioreaktoru, bioreaktoru bez protoka medija, zraka i tlaka, kulturi tkiva i kulturi nasađenoj na agaru. Svinjske rožnice pohranjene u dinamičnom bioreaktoru pokazale su stanje kakvo do sada nije postignuto; epitel je stratificiran i diferenciran, bazalne limbalne stanice nediferencirane te je očuvan integritet endotela. Pretklinička istraživanja u svim područjima koja obuhvaćaju upotrebu tkiva rožnice, kao što su oftalmologija, kozmetologija, analiza lijekova, bi imala korist razvojem metode pohrane rožnice koja održava integritet sva tri sloja rožnice i njihov međusobni odnos (Guindolet i sur., 2017).



Slika 5. Glavne karakteristike kornealnog bioreaktora u CO_2 inkubatoru
1) vrećica za svježi, endotelni medij, 2) otpad medija, 3) boca za epitelni medij, 4,5) peristaltička pumpa, 6) senzor tlaka, 7) mikromagnetni ventil
(prilagođeno prema Guindolet i sur., 2017)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bitan nedostatak *ex vivo* modela rožnice u svrhu ispitivanja permeabilnosti djelatne tvari preko barijere rožnice je osiguravanje primjerenog broja svježih animalnih rožnica i provođenje pokusa permeabilnosti najdulje 2 sata nakon prekida animalne cirkulacije.

Standardna pohrana humanih rožnica u postupku transplantacije rožnice nije primjenjiva za pohranu animalnih rožnica radi ispitivanja permeabilnosti zbog gubitka epitela rožnice u komercijalno dostupnim medijima za pohranu. Naime, epitel je rožnice glavna barijera prijenosu djelatnih tvari preko rožnice, a očuvanje je epitela rožnice važno za provođenje uspješnih *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati jesu li i u kojoj mjeri očuvane barijerne značajke animalnih rožnica nakon provođenja različitih protokola zamrzavanja i odmrzavanja svježe izoliranih animalnih rožnica uz korištenje komercijalno dostupnih medija za pohranu rožnica kao kriozaštitnih sredstava tijekom zamrzavanja rožnica. Korištenjem različitih protokola zamrzavanja i odmrzavanja animalnih rožnica bit će ispitana primarna zaštita animalnih rožnica, dok će korištenjem različitih složenih medija kao kriozaštitnih sredstava biti ispitana sekundarna zaštita animalnih rožnica.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Pri izradi diplomskog rada korišteni su sljedeći materijali i kemikalije: CorneaMax® (Laboratories EUROBIO, Francuska), CorneaJet® (Laboratories EUROBIO, Francuska), oftalmološki kirurški pribor (kliješta, pinceta, škarice, skalpel), etanol (70%, *V/V*), orbitalna tresilica (Environmental Shaker Incubator ES-20/60, Biosan, Latvija), uređaj za mjerenje transepitelnog električnog otpora (Epithelial voltage clamp EC-825A, Warner Instruments, SAD), uranjajući protočni termostat (Julabo, GmbH, Njemačka), peristaltička pumpa (MCP Standard, ISMATEC, Švicarska), horizontalne difuzijske ćelije (Hardvard Apparatus, Holliston, SAD), naponske i strujne elektrode Ag/AgCl (Hardvard Apparatus, Holliston, SAD), posuda s izopropranolom za postupno snižavanje temperature (≈ 1°C/min), zamrzivač pri – 20°C (CNE 63520 PX, BEKO, Turska), biološki zamrzivač pri – 70°C (Ultra Low-Up-right Freezers CVF 110/86 Ing. Climas, Španjolska). Ostale korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće proizvođača Kemig d.o.o.

3.2. Priprava Krebs-Ringerovog pufera

Funkcije Krebs-Ringerovog pufera su održavanje pH i osmotske ravnoteže u mediju te osiguravanje vode i esencijalnih anorganskih iona stanicama (www.sigmaaldrich.com). Pufer se izrađuje na način da se u 1000 mL redestilirane vode postupno dodaju sve sastavnice redom: 6,8 g NaCl, 0,4g KCl, 0,158 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, 2,1 g $NaHCO_3$, 0,26 g $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,2 g $MgSO_4 \times 7\ H_20$, 3,575 g HEPES, 1,1 g D-glukoza monohidrat. Iznimka je u tome da se pripreme 1 M otopine $CaCl_2 \times 2H_2O$ i $MgSO_4 \times 7\ H_20$ te se umjesto gore navedenih masa dodaje 1,77 mL 1 M otopine $CaCl_2 \times 2H_2O$ i 0,81 mL 1 M otopine $MgSO_4 \times 7\ H_20$. Priprema pufera započinje s približno 500 mL redestilirane vode (polovicom ukupnog volumena) u tikvici od l L koja se prenosi na magnetnu mješalicu. Polagano se dodaju sve sastavnice u tikvicu u kojoj se miješa sadržaj. Nakon dodatka svih sastavnica pufera, tikvica se nadopuni redestiliranom vodom do oznake i ostavi na mješalici još 10 minuta. Na kraju se podesi pH pufera na vrijednost 7,4 pomoću 10 M otopine NaOH.

3.3. Prikupljanje i izoliranje animalnih rožnica

Svježe animalne očne jabučice prikupljane su u skladu sa standardnim postupkom prikupljanja očnih jabučica u očnim bankama, a s ciljem osiguranja kvalitete tkiva oka pri prijevozu. Svaka je animalna očna jabučica od lokalne klaonice do istraživačkog laboratorija Zavod za farmaceutsku tehnologiju pojedinačno transportirana u sterilnoj posudi volumena 50 mL. U njoj je prethodno napravljeno gnijezdo od zavojne vate, a zatim je napunjena puferom

(Krebs-Ringerov pufer pH 7,4) do 25 mL. Animalne očne jabučice prikupljane su unutar sat vremena od žrtvovanja životinja. Prije postavljanja, očne jabučice isprane su fiziološkom otopinom (natrijev klorid, 0,9%, Braun) kako bi se odstranila onečišćenja i suvišak. Prilikom polaganja u sterilne posude s gazom i puferom, očne jabučice se lagano prihvaćaju za stražnju stranu, tj. očni živac, pri tome pazeći da rožnica bude u potpunosti uronjena u pufer te da ne dodiruje stijenke posude. Posude s očnim jabučicama čuvane su u prijenosnom hladnjaku pri 4°C do istraživačkog laboratorija.

Postupak izoliranja (ekscizije) svježih animalnih rožnica obavlja se oftalmološkim kirurškim priborom (škarice, skalpel, pinceta) najdulje 2 sata nakon prekida animalne cirkulacije. Tijekom cijelog postupka izoliranja animalnih rožnica, očna jabučica ostaje fiksirana u posudi vlažne komore. Postupak započinje detaljnim, vizualnim pregledom animalne očne jabučice pri čemu se one s vidljivim oštećenjima na površini rožnice uklanjaju. Eksperiment se nastavlja s rožnicama bez tragova oštećenja, uklanjajući pritom pomoćne tvorbe oka kao što su vjeđe i trepavice. Izoliranje rožnice obavlja se na rubu rožnice gdje završava očna spojnica koja na tom mjestu tvori prsten (limbus). Kružnim zarezivanjem u području limbusa načini se kružni rez zahvaćajući 2 do 3 mm bjeloočnice, a ostaci očne spojnice na limbusu pažljivo se odstrane. Rožnica se uz pomoć kirurške pincete prihvaća za rub bjeloočnice te se laganim pokretima ispire u maloj laboratorijskog čaši unutar koje se nalazi KRB **(**Krebs-Ringerov pufer pH 7,4). Nakon ispiranja, rožnica se polaže u plastični spremnik u kojem se nalazi kriozaštitno sredstvo, CorneaMax® ili CorneaJet® medij (prethodno odmrznut na sobnu temperaturu), tako da je konveksna strana rožnice usmjerena prema gore.

3.4. Kriozaštita animalnih rožnica

Animalne rožnice obložene su kriozaštitnim sredstvom postupkom inkubiranja svake animalne rožnice s 3 mL složene otopine kriozaštitnog sredstva (CorneaMax® ili CorneaJet® medija) u pojedinačnom plastičnom spremniku. Proces inkubacije traje 0,5 sati pri 4°C tijekom kojih se ekscizira svih 12 rožnica koje će se podvrgnuti određenom protokolu zamrzavanja. Nakon postupka inkubiranja pri 4°C, animalne rožnice su obrađene prema protokolima zamrzavanja i odmrzavanja (Protokol: 1-3).

3.5. Protokoli zamrzavanja i odmrzavanja rožnica

3.5.1. Protokol 1

Protokol 1 je način zamrzavanja animalnih rožnica u zamrzivaču (CNE 63520 PX, BEKO, Turska) pri -20°C tijekom 2 sata, a zatim u biološkom zamrzivaču (Ultra Low-Up-right Freezers CVF 110/86 Ing. Climas, Španjolska) pri -70°C tijekom 46 sati. Odmrzavanje rožnica provedeno je sukladnom brzom postupku odmrzavanja tijekom kojeg se dodaje 1 mL kriozaštitnog sredstva (prethodno termostatiran pri 37°C) u svaki spremnik s eksciziranom rožnicom. U pripremljene vodene kupelji, prethodno termostatirane pri 37°C, urone se pojedinačni spremnici s izoliranim rožnicama te se inkubiraju 15 minuta pri 37°C. Nakon razdoblja prve inkubacije, kirurškom pincetom vade se rožnice iz spremnika, ispiru u dvjema laboratorijskim čašama napunjenim Krebs-Ringerovim puferom (pH 7,4 pri 37°C) te ih se nakon toga sve zajedno smješta u Petrijevu zdjelicu napunjenu KRB-om. Zatim slijedi dodatna inkubacija rožnica pri 37°C u razdoblju od 15 minuta nakon koje su rožnice spremne za mjerenje transepitelnog električnog otpora.

3.5.2. Protokol 2

Protokol 2 je način zamrzavanja animalnih rožnica u tekućem dušiku pri -196°C tijekom 48 sati. Odmrzavanje rožnica provedeno je sukladnom brzom postupku odmrzavanja opisanom u dijelu 3.5.1.

3.5.3. Protokol 3

Protokol 3 je način zamrzavanja animalnih rožnica u biološkom zamrzivaču (Ultra Low-Up-right Freezers CVF 110/86 Ing. Climas, Španjolska) pri -70°C tijekom 48 sati u posudi s izopropanolom koja osigurava postupno snižavanje temperature (≈ 1°C/min). Odmrzavanje rožnica provedeno je sukladnom brzom postupku odmrzavanja opisanom u dijelu 3.5.1.

3.6. Određivanje TEER-a rožnica

Barijerne značajke rožnica ispitane su mjerenjem transepitelnog električnog otpora (TEER) koristeći vertikalne difuzne ćelije (NaviCyte vertical chamber, Harvard Apparatus, SAD). Ćelije se sastoje od dva dijela koja su čvrsto povezana prstenom koji osigurava da ne dolazi do propuštanja medija koji se koriste u mjerenjima. Rožnice se pričvršćuju između donorskog i receptorskog odjeljka. Kao medij u odjeljcima korišten je KRB, a postavljeno je po 3,5 mL u svaki odjeljak, donorski i receptorski. Sustav ćelija termostatiran je grijaćim blokom koji se spaja na cirkulirajuću vodenu kupelj (ED Julabo, Njemačka). Sve rožnice koje su se zamrzavale i odmrzavale u kriozaštitnim sredstvima, CorneaMax® ili CorneaJet® medijima, pokazale su ružičasto obojenje koje je bilo najintenzivnije nakon provedbe protokola 3. Rožnice su prije postavljanja na ćelije isprane KRB-om.

TEER izoliranih rožnica izmjeren je koristeći uređaj koji mjeri transepitelnu razliku napona (Epithelial Voltage Clamp EC-825A, Warner Instruments, SAD). Otpor je izmjeren pomoću Ag/AgCl elektroda s KCl (Harvard Apparatus, SAD) uronjenih u receptorski i donorski medij. Epitel rožnica fiksiranih u ćelijama usmjeren je prema donorskom odjeljku. Elektrode koje mjere jakost struje postavljene su što je moguće dalje od rožnica kako bi se osigurala ujednačena gustoća struje kroz rožnice. Elektrode koje mjere napon postavljene su što je moguće bliže rožnicama jer se na taj način smanjuje utjecaj otpora medija, koji može utjecati na preciznost instrumenata.

TEER je izračunat korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$TEER = [\mathrm{R} - \mathrm{R}(0)] \times 0{,}64\ cm^2$$

gdje je TEER (Ω × cm²) transepitelni električni otpor, R (Ω) izmjereni otpor, R(0) (Ω) otpor prazne ćelije, a 0,64 cm² difuzijska površina rožnice. Otpor prazne ćelije mjeri se s istim volumenom KRB-a u oba odjeljka, bez postavljene rožnice.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Procjena barijernih značajki rožnica nakon različitih protokola zamrzavanja-odmrzavanja s CorneaMax® medijem kao kriozaštitnim sredstvom

U svrhu praćenja očuvanosti i integriteta epitelne barijere tijekom ispitivanja primarne i sekundarne zaštite rožnica, mjeren je transepitelni električni otpor (TEER). Vrijednost TEER-a služi kao pokazatelj barijernih svojstava epitela (Pepić i sur., 2012) te reflektira očuvanost čvrstih, međustaničnih veza (engl. *tight junction*). Budući da su svinjske oči struktuno najsličnije ljudskim očima u pogledu veličine, debljine rožnice te prisutnosti Bowmannove membrane (Kaluzhny i sur., 2018), u ovom su ispitivanju korištene kao *ex vivo* model za procjenu kriozaštitnog učinka komercijalno dostupnih medija za pohranu.

Svježe animalne očne jabučice nabavljene su iz obližnje klaonice (PIK Vrbovec). Žrtvovane svinje bile su mužjaci i ženke pasmine Veliki jorkšir, starosti 6-7 mjeseci, težine 90-115 kilograma. Unutar dva sata od prekida animalne cirkulacije, obavljen je transport očnih jabučica i ekscizija rožnice. Za ispitivanje svakog protokola zamrzavanja i odmrzavanja u oba medija bilo je potrebno 12 animalnih očnih jabučica. One sa značajnim i vidljivim oštećenjima na površini rožnice su uklonjene i nisu korištene u ispitivanju. Postupci zamrzavanja i odmrzavanja odvijali su se prema protokolima navedenim u dijelu 3.5.

U mediju CorneaMax® pohranjeno je ukupno 36 rožnica; 12 rožnica za ispitivanje pojedinog protokola zamrzavanja. Nakon 48 sati kriopohrane, rožnice prolaze isti postupak odmrzavanja, objašnjen u dijelu 3.5.1., te se postavljaju na ćelije u kojima se nalazi Krebs-Ringerov pufer (pH 7,4 pri 37°C). Otpor je mjeren odmah nakon postavljanja na ćelije - u 0. minuti, zatim u 15. i 30. minuti. Otpor prazne ćelije s KRB puferom iznosi 38,5 Ω te se ta vrijednost naknadno oduzima ukupnom otporu. TEER vrijednosti svih rožnica izračunate su prema jednadžbi /1/. U tablici 1., 2. i 3. prikazane su izmjerene vrijednosti otpora nakon kriopohrane u mediju CorneaMax®, a za svako razdoblje mjerenja navedena je srednja vrijednost TEER-a uz standardnu devijaciju. Na osnovu izmjerenih vrijednosti TEER-a procjenjuje se kriozaštitni učinak komercijalno dostupnog medija, CorneaMax®. Prema literaturnim podacima, TEER vrijednosti svježih, animalnih rožnica *ex vivo* modela su u rasponu od 604 do 829 Ω × cm² (Juretić i sur., 2018). Stoga je u ovom ispitivanju kao vrijednost kontrolne skupine uzeta srednja vrijednost tog raspona koja služi za usporedbu i procjenu dobivenih rezultata (Slika 6).

Tablica 1. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 1 s CorneaMax® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

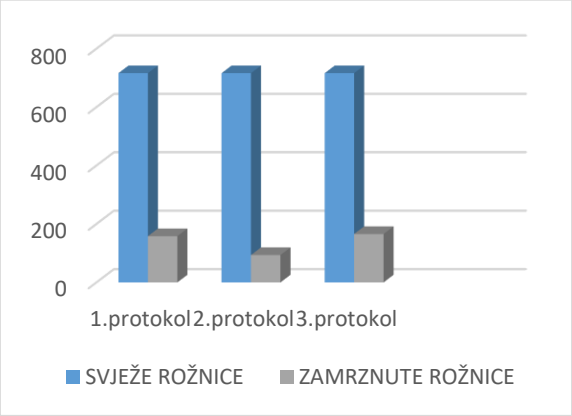
	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	241	129,6	233	124,48	222	117,44
2	243	130,88	247	133,44	243	130,88
3	292	162,24	289	160,32	291	161,6
4	380	218,56	373	214,08	377	216,64
5	137	63,04	130	58,56	123	54,08
6	229	121,92	223	118,08	206	107,2
7	316	177,6	302	168,64	281	155,2
8	392	226,24	388	223,68	392	226,24
9	374	214,72	367	210,24	362	207,04
10	489	288,32	494	291,52	501	296
11	171	84,8	165	80,96	163	79,68
12	230	122,56	223	118,08	211	110,4
n=12		161,71±65,53		158,51±66,65		155,2±69,82

Tablica 2. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 2 s CorneaMax® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	209	109,12	208	108,48	230	122,56
2	166	81,6	162	79,04	165	80,96
3	79	25,92	77	24,64	71	20,8
4	100	39,36	97	37,44	93	34,88
5	220	116,16	213	111,68	210	109,76
6	130	58,56	130	58,56	126	56
7	316	177,6	304	169,92	265	144,96
8	245	132,16	267	146,24	248	134,08
9	214	112,32	213	111,68	191	97,6
10	195	100,16	185	93,76	158	76,48
11	186	94,4	183	92,48	168	82,88
12	231	123,2	220	116,16	199	102,72
n=12		97,55±41,86		95,84±41,85		88,64±38,03

Tablica 3. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 3 s CorneaMax® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	315	176,96	340	192,96	333	188,48
2	175	87,36	175	87,36	163	79,68
3	222	117,44	225	119,36	203	105,28
4	402	232,64	407	235,84	398	230,08
5	137	63,04	123	54,08	133	60,48
6	179	89,92	163	79,68	162	79,04
7	275	151,36	256	139,2	287	159,04
8	481	283,2	492	290,24	525	311,36
9	237	127,04	220	116,16	227	120,64
10	305	170,56	258	140,48	297	242,99
11	507	299,84	504	297,92	499	294,72
12	331	187,2	321	180,8	316	177,6
n=12		165,55±75,88		161,17±80,10		170,78±85,30



Slika 6. Usporedba TEER vrijednosti svježih rožnica i zamrznutnih rožnica u CorneaMax® mediju.

Određivanjem vrijednosti TEER-a moguće je opaziti da se kripohranom narušava epitelna barijera rožnice, što je donekle u skladu s očekivanjima s obzirom na dosadašnje učinke kriopohrane na endotel rožnice. Takav utjecaj najizraženiji je u postupku zamrzavanja prema protokolu 2 u kojemu vrijednost TEER-a drastično pada na približno 13% vrijednosti TEER-a svježeg animalnog modela rožnice. U skupini uzoraka rožnica koje su zamrzavane prema protokolu 3 opaža se najbolje očuvanje epitelne barijere u ovom mediju (23%), a objašnjenje bi moglo biti u postupnom snižavanju temperature u posudi s izopropranolom. To je ujedno jedini protokol unutar kojeg vrijednosti TEER-a rastu s vremenom.

4.2. Procjena barijernih značajki rožnica nakon različitih protokola zamrzavanja-odmrzavanja s CorneaJet® medijem kao kriozaštitnim sredstvom

Kao u ispitivanju kriozaštitnog učinka medija CorneaMax®, u mediju CorneaJet® pohranjeno je ukupno 36 rožnica; 12 rožnica prolazi kroz svaki pojedini protokol zamrzavanja, a nakon 48 sati kriopohrane prolaze isti postupak odmrzavanja te se postavljaju na ćelije u kojima se nalazi Krebs-Ringerov pufer (pH 7,4 pri 37°C). Otpor je mjeren odmah nakon postavljanja na ćelije- u 0. minuti, nakon 15 minuta te nakon 30 minuta. Otpor prazne ćelije s KRB puferom iznosi 38,5 Ω te se ta vrijednost naknadno oduzima ukupnom otporu. TEER vrijednosti svih rožnica izračunate su prema jednadžbi /1/. U tablici 4., 5. i 6. prikazani su rezultati mjerenja kriopohrane, a za svako razdoblje mjerenja TEER-a navedene su srednje vrijednosti uz standardnu devijaciju. Na osnovu izmjerenih vrijednosti TEER-a, procjenjuje se kriozaštitni učinak komercijalno dostupnog medija, CorneaJet®. Prema literaturnim podacima, TEER vrijednosti svježih, animalnih rožnica *ex vivo* modela su u rasponu od 604 do 829 Ω × cm². U ovom ispitivanju kao vrijednost kontrolne skupine uzeta je srednja vrijednost tog raspona koja služi za usporedbu dobivenih rezultata (Slika 7).

Tablica 4. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 1 s CorneaJet® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

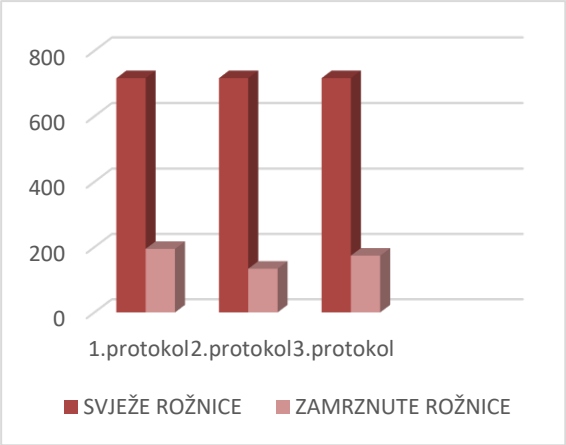
	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	494	291,52	529	313,92	569	339,52
2	303	169,28	300	167,36	295	164,16
3	411	238,4	400	231,36	389	224,32
4	245	132,16	241	129,6	240	128,96
5	189	96,32	180	90,56	174	86,72
6	438	255,68	440	256,96	443	258,88
7	389	224,32	373	214,08	366	209,6
8	395	228,16	399	230,72	402	232,64
9	291	161,6	287	159,04	282	155,84
10	302	168,64	283	156,48	270	148,16
11	294	163,52	267	146,24	250	135,36
12	417	242,24	406	235,2	390	224,96
n=12	197,65±57,32		194,29±62,10		192,43±69,15	

Tablica 5. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 2 s CorneaJet® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	304	169,92	285	157,76	260	141,76
2	208	108,48	203	105,28	184	93,12
3	223	118,08	222	117,44	214	112,32
4	380	218,56	366	209,6	360	205,76
5	229	121,92	218	114,88	195	100,16
6	273	150,08	261	142,4	254	137,92
7	217	114,24	203	105,28	189	96,32
8	215	112,96	200	103,26	190	96,96
9	241	129,6	225	119,36	204	105,92
10	333	188,48	328	185,28	316	177,6
11	283	156,48	277	152,64	265	144,96
12	210	109,76	199	102,72	187	95,04
n=12		141,55±35,65		134,66±35,35		125,65±36,67

Tablica 6. TEER vrijednosti animalnih rožnica nakon zamrzavanja i odmrzavanja prema Protokolu 3 s CorneaJet® medijem kao kriozaštitnim sredstvom.

	t = 0 min		t = 15 min		t = 30 min	
Rožnica broj	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)	R (Ω)	TEER (Ω × cm²)
1	370	212,16	355	202,56	339	192,32
2	205	106,56	197	101,44	193	98,88
3	321	180,8	315	176,96	303	169,28
4	196	100,8	191	97,6	186	94,4
5	580	346,56	562	335,04	559	333,12
6	269	147,52	255	138,56	245	132,16
7	258	140,48	254	137,92	253	137,28
8	278	153,28	266	145,6	245	132,16
9	280	154,56	267	146,24	252	136,64
10	322	181,44	309	173,12	308	172,48
11	308	172,48	291	161,6	275	151,36
12	508	300,48	447	261,44	412	239,04
n=12		183,09±73,16		173,17±67,28		165,76±65,94



Slika 7. Usporedba TEER vrijednosti svježih rožnica i zamrznutnih rožnica u CorneaJet® mediju.

Nakon kriopohrane rožnica u CorneatJet® mediju, dobiveni su rezultati vrlo slični onima nakon kriopohrane u CorneaMax® mediju. Niske vrijednosti TEER-a upućuju na iznimno oštećenje i narušavanje epitelne barijere. Najveća očuvanost rožnica postiže se prvim protokolom zamrzavanja gdje TEER ispitivanih animalnih rožnica iznosi približno 27% vrijednosti TEER svježih rožnica, a najmanja provedbom protokola 2 gdje iznosi oko 19%. Vizualnom procjenom primijećeno je ružičasto obojenje animalnih rožnica što je posljedica kriopohrane u obojenim medijima CorneaMax® i CorneaJet®.

Iz navedenih rezultata proizlazi da je najslabija primarna zaštita rožnica postignuta provedbom protokola 2 u oba medija, dok je vršenjem protokola 1 i 3 zaštita rožnica i dalje nedovoljna, ali ipak kvalitetnija. Takav se rezultat može objasniti pretpostavkom da epitel rožnice ne podnosi nagle i agresivne uvjete kripohrane u tekućem dušiku bez prikladnog krioprotektora. S druge strane, više vrijednosti TEER-a primijećene su u oba medija provedbom protokola 1 i 3 gdje dolazi do postupnog snižavanja temperature. Saznanja o protokolima zamrzavanja potrebno je potkrijepiti dodatnim ispitivanjima radi vrednovanja njihovog utjecaja u postupcima kriopohrane rožnica.

Korištenjem složenih medija kao kriozaštitnih sredstava ispitana je sekundarna zaštita animalnih rožnica. Usporedbom svih protokola zamrzavanja u oba medija, medij CorneaJet® pokazuje minimalno bolji ukupni učinak na očuvanje epitelne barijere u odnosu na medij CorneaMax®, što je najvjerojatnije posljedica prisutnosti dekstrana u mediju CorneaJet®.

Ukupno analizirajući, određene vrijednosti TEER-a kripohranjenih rožnica drastično su smanjene u odnosu na vrijednosti TEER-a svježih rožnica, odnosno, takva primarna i sekundarna zaštita kornealnog epitela nije prikladna. Takav *ex vivo* model, zamrznut u medijima CorneaMax® i CorneaJet® pri navedenim uvjetima različitih protokola, ne može poslužiti kao model za testiranja permeabilnosti oftalmika. Ipak, određene vrijednosti mogu poslužiti u daljnjem radu: istraživanju različitih vrsta krioprotektora koji bi mogli imati značajnu ulogu u očuvanju epitela pri kriopohrani rožnica i unaprjeđenju kriopohrane kao dugotrajne metode pohrane, ne samo u svrhu pretkliničkih istraživanja permeabilnosti lijekova nego i u povećanju kvalitete procesa transplantacije u očnim bankama.

5. ZAKLJUČCI

- Standardne pohrane humanih rožnica nisu primjenjive za pohranu animalnih rožnica u svrhu ispitivanja permeabilnosti lijekova zbog gubitka epitela koji je glavna barijera rožnice.
- Kriopohrana animalnih rožnica ima značajan potencijal i prednosti u smislu moguće metode dugotrajne pohrane, uz mogućnost očuvanja živog tkiva rožnice na relativno dugo razdoblje.
- Primjereno zaštićene i kriopohranjene rožnice mogu poslužiti kao vrijedan alat za različita pretklinička ispitivanja.
- Očuvanost i integritet barijere rožnice tijekom i nakon kriopohrane moguće je primjereno pratiti određivanjem vrijednosti transepitelnog električnog otpora (TEER) koje su u recipročnom odnosu s barijernim značajkama epitela rožnice.
- Kriopohranom rožnica u medijima CorneaMax® i CorneaJet® tijekom 48 sati dokazano je narušavanje epitelne barijere; kriozaštita u navedenim uvjetima nije prikladna te takve rožnice ne mogu poslužiti kao modeli za testiranje permeabilnosti lijekova u pretkliničkim istraživanjima.
- Najniže vrijednosti dobivene su zamrzavanjem u tekućem dušiku, a postupno snižavanje temperature tijekom postupka zamrzavanja pokazuje bolji stupanj očuvanja epitelne barijere rožnice.
- Dobivena saznanja o protokolima zamrzavanja kao primarnoj zaštiti rožnica potrebno je potkrijepiti dodatnim ispitivanjima radi vrednovanja njihovog utjecaja u postupcima kriopohrane rožnica.
- Medij CorneaJet® kao kriozaštitno sredstvo pokazao je bolju ukupnu sekundarnu zaštitu barijere rožnice u odnosu na medij CorneaMax®.
- Određene vrijednosti TEER-a mogu poslužiti u daljnjem radu i analizi različitih vrsta kriozaštitnih tvari koji imaju značajnu ulogu u sekundarnoj zaštiti epitela pri kriopohrani rožnica.

6. LITERATURA

Armitage WJ. Preservation of human cornea. *Transfus Med Hemother*, 2011, 38, 143-147.

Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea*, 1997, 16, 215-223.

Bredehorn-Mayr T, Duncker GIW, Armitage WJ. Eye Banking. Basel, New York, Karger, 2009, str. 64.

Chow S, Di Girolamo N. Vitronectin: a migration and wound healing factor for human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55, 6590-6600.

CorneaJet.

http://www.eurobio-cornea.com/images/Image/File/Cornea/CMXREL01F%20-%20CorneaJet%20V1_00.pdf [pristupljeno 10. 09. 2018].

CorneaMax.

http://www.eurobio-cornea.com/images/Image/File/Cornea/CMXSTO01F%20-%20CorneaMax%20V1_00.pdf [pristupljeno 10. 09. 2018].

DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*, 2011, 37, 588-598.

Duncan K, Parker J, Hoover C, Jeng BH. The effect of light exposure on the efficacy and safety of amphotericin B in corneal storage media. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134, 432-436.

Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the cornea: structure, function, and development. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 134, 7-23.

Guindolet D, Crouzet E, He Z, Herbepin P, Jumelle C, Perrache C, Dumollard JM, Forest F, Peoc'h M, Gain P, Gabison E, Thuret G. Storage of porcine cornea in an innovative bioreactor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58, 5907-5917.

Jirsova K. Light and specular microscopy of the cornea. Prague, Springer, 2017, str. 2-8, 41-46.

Juretić M, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Biopharmaceutical evaluation of surface active ophthalmic excipients using in vitro and ex vivo corneal models. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 120, 133-141.

Kaluzhny Y, Kinuthia MW, Truong T, Lapointe AM, Hayden P, Klausner M. New human organotypic corneal tissue model for ophtalmic drug delivery studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59, 2880-2898.

Kapur R, Tu EY, Pendland SL, Fiscella R, Sugar J. The effect of temperature on the antimicrobial activity of Optisol-GS. *Cornea*, 2006, 25, 319-324.

Layer N, Cevallos V, Maxwell AJ, Hoover C, Keenan JD, Jeng BH. Efficacy and safety of antifungal additives in Optisol-GS corneal storage medium. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132, 832-837.

Parekh M, Ferrari S, Salvalaio G, Ponzin D. Synthetic versus serum-based medium for corneal preservation in organ culture: a comparative study between 2 different media. *Eur J Ophtalmol*, 2015, 25, 96-100.

Parekh M, Elbadawy H, Salvalaio G, Amoureux MC, Di Iorio E, Fortier D, Ponzin D, Ferrari S, Ruzza A. Recombinant human serum albumin for corneal preservation. *Acta Ophthalmol*, 2018, 96, 79-86.

Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči. *Farm Glas*, 2004, 60, 311-328.

Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku. *Farm Glas*, 2012, 68, 177-200.

Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čižmek B, Reichl S, Filipović-Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug Discov Today*, 2014, 19, 31-44.

Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *BR J Ophthalmol*, 2004, 88, 560-565.

Redbrake C, Salla S, Nilius R, Becker J, Reim M. A histochemical study of the distribution of dextran 500 in human corneas during organ culture. *Curr Eye Res*, 1997, 16, 405-411.

Schmid R, Tarau IS, Rossi A, Leonhardt S, Schwarz T, Schuerlein S, Lotz C, Hansmann J. *In vivo*-like culture conditions in a bioreactor facilitate improved tissue quality in corneal storage. *Biotechnol J*, 2018, 13

Schönfelder J, Valtink M, Knels L, Funk RHW, Engelmann K, Wetzel C. Quality assessment of corneal storage media and their components. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252, 77-82.

Sigma Aldrich, Krebs-Ringer bicarbonate buffer. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/k4002pis.pdf [pristupljeno 1.9.2018.]

Smith VA, Johnson TK. Identification and evaluation of a thinning agent compatible with MegaCell DCS, an animal product-free corneal storage medium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250, 1777-1786.

Soni NG, Hoover CK, Da Silva H, Jeng BH. Preservation of the corneal epithelium in different corneal storage media. *Cornea*, 2015, 34, 1400-1403.

Valtink M, Donath P, Engelmann K, Knels L. Effect of different culture media and deswelling agents on survival of human corneal endothelial and epithelial cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254, 285-295.

Zhao M, Campolmi N, Thuret G, Piselli S, Acquart S, Peoc'h M, Gain P. Poloxamines for deswelling of organ-cultured corneas. *Ophthalmic Res*, 2012, 48, 124-133.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Sve raširenijom potrošnjom oftalmičkih lijekova dolazi do povećane potrebe za pretkliničkim istraživanjima lijekova. Nedostaci *ex vivo* modela rožnice u svrhu ispitivanja permeabilnosti djelatne tvari preko barijere rožnice su osiguravanje primjerenog broja animalnih rožnica te brzo provođenje pokusa. Budući da je epitel glavna barijera prijenosu djelatnih tvari, a standardnom pohranom humanih rožnica stvaraju se velika epitelna oštećenja, takva pohrana nije primjenjiva za ispitivanja permeabilnosti na animalnim rožnicama.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati primarnu i sekundarnu zaštitu rožnica kriopohranjenih u složenim medijima kao kriozaštitnim sredstvima korištenjem različitih protokola zamrzavanja i odmrzavanja. Primjereno kriozaštićene rožnice mogu poslužiti kao vrijedan alat za pretklinička istraživanja. Očuvanost i integritet epitelne barijere rožnice procijenjeni su pomoću vrijednosti izmjerenog transepitelnog električnog otpora.

Rezultati ukazuju na oštećenje i narušavanje epitelne barijere tijekom 48 sati kriopohrane u komercijalno dostupnim medijima za pohranu rožnice, CorneaMax® i CorneaJet®. Najslabija primarna zaštita opažena je provođenjem protokola zamrzavanja u tekućem dušiku pri -196°C, dok su više vrijednosti opažene postupnim zamrzavanjem rožnica. Medij CorneaJet® kao kriozaštitno sredstvo pokazao je bolju ukupnu sekundarnu zaštitu rožnica tijekom kriopohrane u odnosu na medij CorneaMax®.

The increased use of ophthalmic medications leads to an increased demand for preclinical drug research. The disadvantages of the use of *ex vivo* corneal model for examining the permeability of active substance through corneal barrier are ensuring an adequate number of animal corneas and the immediate conduct of the experiment. Since epithelium is the main barrier to the transfer of active substances, and the standard storage of human corneas causes serious epithelial damage, that type of storage is not suitable for permeability tests on animal corneas.

The aim of this thesis is to examine the primary and secondary protection of cornea cryopreserved in complex media as cryoprotective agents, by using different freezing and thawing protocols. Properly cryoprotected corneas can be used as a valuable tool for preclinical research in ophthalmology. The preservation and integrity of epithelial barrier were estimated by measuring the transepithelial electrical resistance.

The results indicate damage and deterioration of the epithelial barrier during 48 hours of cryopreservation in two commercially available corneal storage media, CorneaMax® i CorneaJet®. The lowest primary protection has been proved by the application of the liquid nitrogen freezing protocol at -196°C, while higher values have been obtained by gradual freezing. CorneaJet® medium has shown better overall secondary protection as a cryoprotective agent compared to CorneaMax® medium.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE KRIOZAŠTITNOG UČINKA KOMERCIJALNO DOSTUPNIH MEDIJA ZA POHRANU ROŽNICA

Josipa Stjepanović

SAŽETAK

Sve raširenijom potrošnjom oftalmičkih lijekova dolazi do povećane potrebe za pretkliničkim istraživanjima lijekova. Nedostaci *ex vivo* modela rožnice u svrhu ispitivanja permeabilnosti djelatne tvari preko barijere rožnice su osiguravanje primjerenog broja animalnih rožnica te brzo provođenje pokusa. Budući da je epitel glavna barijera prijenosu djelatnih tvari, a standardnom pohranom humanih rožnica stvaraju se velika epitelna oštećenja, takva pohrana nije primjenjiva za ispitivanja permeabilnosti na animalnim rožnicama.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati primarnu i sekundarnu zaštitu rožnica kriopohranjenih u složenim medijima kao kriozaštitnim sredstvima korištenjem različitih protokola zamrzavanja i odmrzavanja. Primjereno kriozaštićene rožnice mogu poslužiti kao vrijedan alat za pretklinička istraživanja. Očuvanost i integritet epitelne barijere rožnice procijenjeni su pomoću vrijednosti izmjerenog transepitelnog električnog otpora.

Rezultati ukazuju na oštećenje i narušavanje epitelne barijere tijekom 48 sati kriopohrane u komercijalno dostupnim medijima za pohranu rožnice, CorneaMax® i CorneaJet®. Najslabija primarna zaštita opažena je provođenjem protokola zamrzavanja u tekućem dušiku pri -196°C, dok su više vrijednosti opažene postupnim zamrzavanjem rožnica. Medij CorneaJet® kao kriozaštitno sredstvo pokazao je bolju ukupnu sekundarnu zaštitu rožnica tijekom kriopohrane u odnosu na medij CorneaMax®.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 7 grafičkih prikaza, 6 tablica i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kriopohrana, epitel, transepitelni električni otpor

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Višnja Drinovac Vlah, *viša asistentica-poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

AN EXAMINATION OF THE CRYOPROTECTIVE EFFECT OF COMMERCIALLY AVAILABLE PRESERVATION MEDIA

Josipa Stjepanović

SUMMARY

The increased use of ophthalmic medications leads to an increased demand for preclinical drug research. The disadvantages of the use of *ex vivo* corneal model for examining the permeability of active substance through corneal barrier are ensuring an adequate number of animal corneas and the immediate conduct of the experiment. Since epithelium is the main barrier to the transfer of active substances, and the standard storage of human corneas causes serious epithelial damage, that type of storage is not suitable for permeability tests on animal corneas.
The aim of this thesis is to examine the primary and secondary protection of cornea cryopreserved in complex media as cryoprotective agents, by using different freezing and thawing protocols. Properly cryoprotected corneas can be used as a valuable tool for preclinical research in ophthalmology. The preservation and integrity of epithelial barrier were estimated by measuring the transepithelial electrical resistance.
The results indicate damage and deterioration of the epithelial barrier during 48 hours of cryopreservation in two commercially available corneal storage media, CorneaMax® i CorneaJet®. The lowest primary protection has been proved by the application of the liquid nitrogen freezing protocol at -196°C, while higher values have been obtained by gradual freezing. CorneaJet® medium has shown better overall secondary protection as a cryoprotective agent compared to CorneaMax® medium.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 6 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cryopreservation, epithelium, transepithelial electrical resistance

Mentor: **Ivan Pepić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac Vlah, **Ph.D.** *Assistant-postdoctorand,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2018.