Prikladnost in vitro modela rožnice za ispitivanje biokompatibilnosti oftalmičkih in situ gelirajućih sustava

Nenadić, Mirta

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:964645

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Mirta Nenadić

Prikladnost *in vitro* modela rožnice za ispitivanje biokompatibilnosti oftalmičkih *in situ* gelirajućih sustava

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biofarmacija s farmakokinetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasmine Lovrić.

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na pruženoj prilici, prenesnom znanju, strpljenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Asistentici Marini Juretić, mag.pharm., zahvaljujem na pruženoj pomoći i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
   1.1. PROBLEMI U TERAPIJI OČNIH BOLESTI 1
   1.2. ROŽNICA 2
      1.2.1. *In vitro* stanični modeli epitela rožnice 3
   1.3. POLIMERI 6
      1.3.1. Utjecaj viskoznosti polimernog sustava na bioraspoloživost 6
   1.4. HIDROGELOVI 7
   1.4.1. *In situ* gelirajući sustavi 8
   1.4.2. Poloksameri 8
   1.4.3. Sigurnost primjene P407 u oftalmičkim pripravcima 11
   1.4.4. Kitozan 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 13
3. MATERIJALI I METODE 14
   3.1. MATERIJALI 14
   3.2. METODE 14
      3.2.1. Uvjeti uzgoja stanica 14
      3.2.2. Monosloj HCE-T 15
      3.2.3. *In vitro* model epitela rožnice 15
      3.2.4. Mjerenje transepitelnog električnog otpora 16
      3.2.5. MTT test 16
         3.2.5.1. Ispitivanje citotoksičnosti na monosloju humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T 16
         3.2.5.2. Ispitivanje citotoksičnosti na *in vitro* modelu rožnice temeljenog na dvosloju i višesloju humanih epitelnih stanica HCE-T 17
      3.2.6. Obrada rezultata 17
4. REZULTATI I RASPRAVA 18
   4.1. STANIČNA VIJABILNOST MONOSLOJA HUMANIH EPITELNIH STANICA ROŽNICE 18
   4.2. STANIČNA VIJABILNOST *IN VITRO* MODELA EPITELA ROŽNICE 20
5. ZAKLJUČCI 25
6. LITERATURA 26
7. SAŽETAK/SUMMARY 31

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1.PROBLEMI U TERAPIJI OČNIH BOLESTI

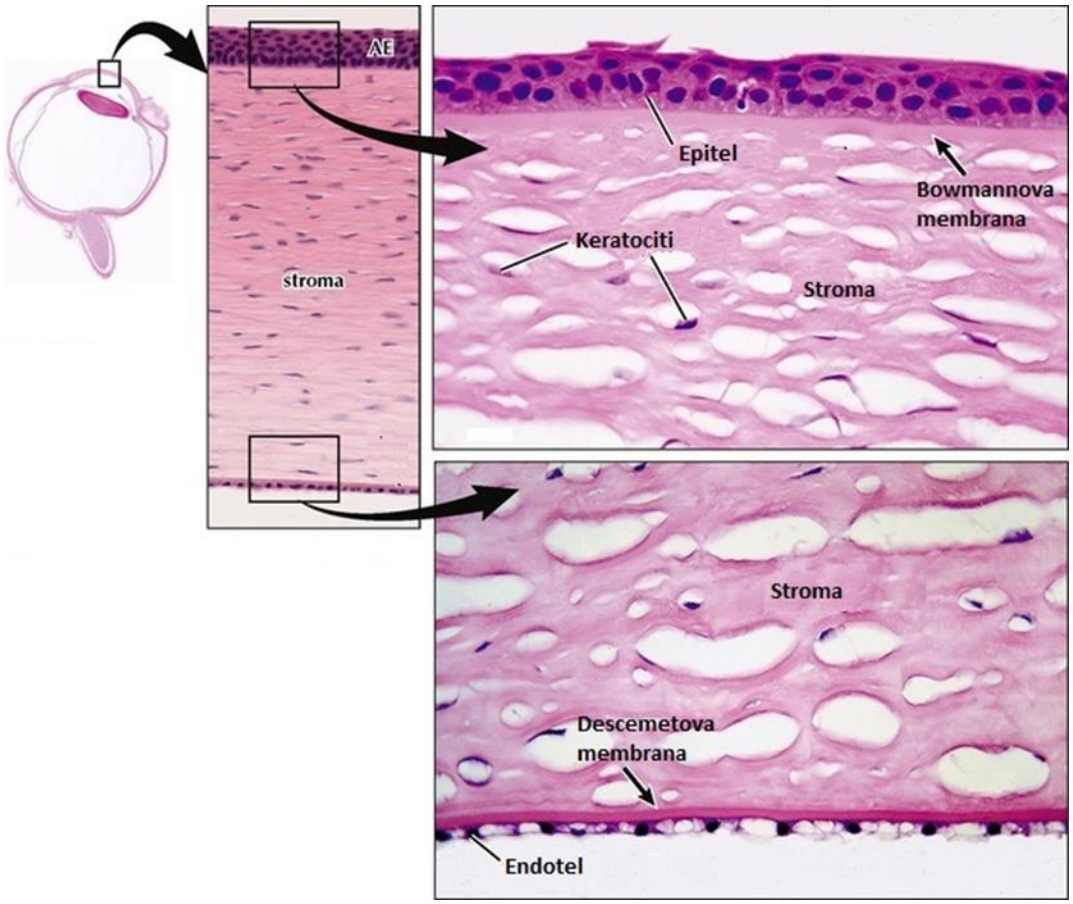
Glavni problemi primjene kapi za oko, kao najpropisivanijeg farmaceutskog oblika u liječenju bolesti oka, leže u kratkom vremenu zadržavanja djelatne tvari na površini oka, odnosno brzoj eliminaciji djelatne tvari zbog dinamike suzne tekućine. Apsorpcija lijeka je velika pri primjeni, nakon čega slijedi pad apsorpcije, a samo se 1 do 10 % ukupno primjenjene doze apsorbira. Dakle, početni period je period predoziranosti, nakon čega slijedi dugi period u kojem je koncentracija lijeka ispod terapijske koncentracije. U slučaju ukapavanja preobilnog volumena dio pripravka se gubi već pri samoj primjeni, što će istodobno potaknuti izlučivanje suza koje se miješaju s pripravkom i razrjeđuju ga (Pepić, 2004a).

Ljekovite su masti često propisivani oblik u oftalmologiji, a prednost im je kao i uljnim otopinama u duljem zadržavanju na oku, odnosno duljem kontaktu djelatne tvari s površinom oka. Zajednički nedostatak masti i uljnih otopina je zamućenje vida koje se javlja nakon primjene. Vodene ili uljne suspenzije izrađuju se u slučaju slabo topljivih djelatnih tvari (primjerice kortikosteroidi) ili kada se želi postići produljeni učinak. Glavna poteškoća leži u nedovoljnoj homogenosti pripravka koja se mora osigurati tijekom primjene kako bi se omogućila točnost doziranja. Drugi problem kod suspenzija je mogućnost nastanka kristala prilikom skladištenja, pa se zbog toga mora pri razvoju lijeka ispitati utjecaj uvjeta skladištenja na veličinu čestica kako bi se izbjegli mehanički nadražaji oka (Senjković, 2003).

Broj oboljelih od očnih bolesti je u porastu te je stoga cilj unaprijediti oftalmičke ljekovite pripravke kako bi se postiglo produljeno zadržavanje lijeka na površini oka, poboljšala bioraspoloživost lijeka te posljedično smanjila učestalost doziranja. Ljekoviti pripravak također bi trebao biti što jednostavniji za primjenu, neiritirajući i sa što manjom interferencijom sa vidom. Time bi se povećala i adherencija bolesnika, a sve zajedno pridonijelo bi značajnom poboljšanju terapijskog ishoda.

1.2.ROŽNICA

Većina klinički značajnih oftalmika apsorbira se preko rožnice. Rožnica nema krvnih žila, hranjive tvari i dio kisika prima iz rubne mreže krvnih žila, a preostali kisik prima iz atmosfere. Sastoji se od 5 dijelova: epitela, Bowmannove membrane, strome rožnice, Descemetove membrane i endotela (Pepić, 2004a). Svaki od tih slojeva ima svoju posebnu ulogu u održavanju normalnog vida i različite karakteristike u kontekstu apsorpcije lijeka (Hahne i Reichl, 2011).



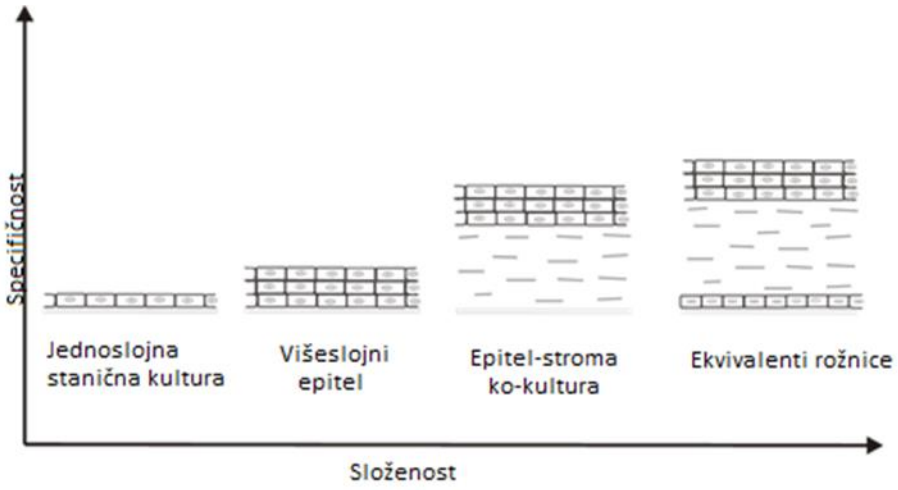
Slika 1.Poprečni presjek rožnice (preuzeto s https://basicmedicalkey.com/eye-and-adnexa-2/)

S farmakokinetičkog stajališta, rožnica se može promatrati kroz tri sloja: vanjski lipofilni epitel, središnju hidrofilnu stromu te unutrašnji lipofilni endotel. Hidrofilnim lijekovima je epitel rožnice ograničavajući čimbenik apsorpcije, a stroma rožnice lipofilnim lijekovima pruža otpor pri apsorpciji (Pepić i sur., 2012). Čvrste međustanične veze višeslojnog epitela rožnice (*engl.* tight junctions) služe kao selektivna barijera za male hidrofilne molekule i sprječavaju difuziju makromolekula paracelularnim putem (Almeida i sur., 2014).
Lijek kroz epitel rožnice može prolaziti paracelularno ili transcelularno. Paracelularni put daje prednost hidrofilnim lijekovima, dok transcelularni lipofilnim (Pepić, 2004a). Transkornealnu apsorpciju otežava vezanje ili zadržavanje lijeka u slojevima rožnice. Za učinkovitu transkornealnu apsorpciju lijek bi trebao imati i lipofilne i hidrofilne karakteristike te dovoljno malu veličinu molekula. Struktura i integritet rožnice, fizičko-kemijska svojstva primjenjenog lijeka te oblik u koji je lijek uklopljen tri su glavna čimbenika koja utječu na učinkovitost transkornealne apsorpcije (Pepić, 2004a).

1.2.1. *In vitro* stanični modeli epitela rožnice

Stanični modeli rožnice pretežno su razvijani za ispitivanja citotoksičnosti *in vitro* kao alternativa ispitivanjima toksičnosti na animalnim modelima *in vivo* (Draize test), a vrlo su korisni pri ispitivanjima transkornealne permeacije tvari. Koriste se različite kulture primarnih stanica i stanične linije epitelnih stanica rožnice kunića, štakora, čovjeka (Pepić i sur., 2012; Pepić i sur., 2014). Iako primarne stanice odražavaju *in vivo* uvjete točnije, prednosti imortaliziranih staničnih linija su produženi životni vijek, mogućnost velikog broja pasaža i lakši uzgoj (Hahne i Reichl, 2011), morfološki su slične normalnim epitelnim stanicama rožnice, stvaraju primjerenu *in vitro* barijeru (TEER 400–800 Ω cm^2), u kulturi stvaraju 5–8 slojeva stanica s čvrstim međustaničnim vezama, dezmosomima, i mikrovilima (Pepić i sur., 2012). Praktičnije su jer se mogu smrznuti i ponovno odmrznuti kad je to potrebno (Ranta i sur., 2003).

Kroz godine ispitivano je nekoliko modela rožnice, a od svih modela za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti lijekova najbolje je opisana HCE-T stanična linija. Modeli rožnice variraju od jednostavnih jednoslojnih kultura, višeslojnih staničnih kultura, do epitel-stroma ko-kultura, te tkivnim inženjerstvom stvorenih trodimenzionalnih ekvivalenata rožnice (Huhtala i sur., 2008).



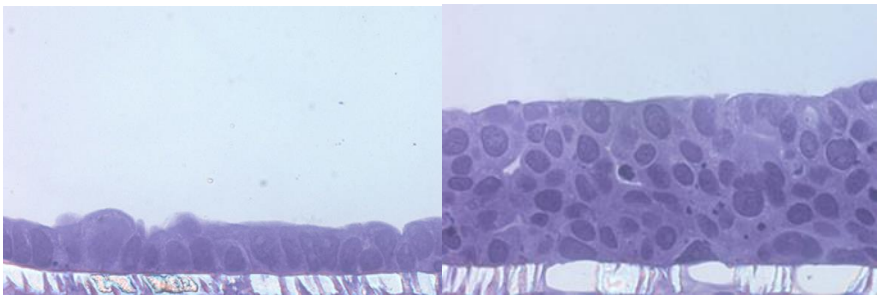
Slika 2. *In vitro* modeli rožnice (preuzeto i prilagođeno iz Huhtala i sur., 2008).

Pojam monosloja staničnih kultura opisuje distribuciju stanica u jednom sloju, odnosno dvije dimenzije (2D modeli) (Elsheikh i sur., 2014). *In vitro* model rožnice temeljen na monosloju epitelnih stanica rožnice koristi se za provođenje različitih testova citotoksičnosti, uključujući ispitivanje učinka na staničnu proliferaciju (ugradnja obilježenog timidina ili bromodeoksiuridina), određivanje koncentracije proteina različitim kolorimetrijskim testovima, određivanjem metaboličke aktivnosti stanica (primjerice MTT test), određivanje integriteta stanične membrane (primjerice LDH test, bojenje propidij jodidom) i dr. (Huhtala i sur., 2008).

In vitro višeslojni trodimenzionalni (3D) HCE-T model temelji se na uzgoju HCE-T stanične linije na poroznoj sintetskoj membrani koja odjeljuje donorski (apikalni) i receptorski (bazolateralni) odjeljak ispunjen hranidbenim medijem kroz nekoliko dana. Uklanjanjem medija iz donorskog odjeljka, odnosno izlaganjem modela zraku potiče se diferencijacija i stvaranje višeslojnog epitela (Hahne i Reichl, 2011). To su modeli koji puno bolje oponašaju *in vivo* uvjete rasta stanica upravo zbog složenije tkivne strukture.

Pokazalo se da su glavni izazovi *in vitro* modela rožnice održavanje određenih uvjeta uzgoja što vodi stvaranju višeslojnog epitela sa čvrstim međustaničnim vezama (Juretić i sur., 2017). Korištenje propusnih membrana omogućuje stanicama da rastu u polariziranom stanju, da se hrane medijem iz bazolateralnog (receptorskog) odjeljka i stoga dobro oponašaju metaboličku aktivnost epitelnih stanica in vivo. Materijal od kojeg je izgrađena propusna membrana, veličina pora membrane i oblaganje membrane proteinima izvanstaničnog matriksa bitni su faktori u razvoju staničnog modela. Uobičajeno se epitelne stanice rožnice uzgajaju na

polikarbonatnim ili poliesterskim membranama neobloženim ili obloženim kolagenom, lamininom i fibronektinom. Kolagen pomaže stanicama da se pričvrste na membranu i stimulira njihovu diferencijaciju i proliferaciju. Izlaganje modela zraku pokazalo se kritičnim u stvaranju višeslojnog epitela (Hornof i sur., 2005).



a) b)

Slika 3. Poprečni presjek HCE-T staničnog modela na polikarbonatnoj membrani; monosloj stanica (a) i višeslojni epitel nakon izlaganja zraku (b) (Hahne i Reichl, 2011).

Uzimajući u obzir kako promjena samo jednog faktora pri uzgoju stanica može rezultirati drukčijom barijerom *in vitro* HCE-T modela, potrebno je postupak standardizirati kako bi se smanjile mogućnosti pogrešaka i razlika u dobivenim podacima između različitih laboratorija, ali i unutar istoga, te kako bi takve podatke mogli interpretirati i međusobno uspoređivati. U nedavno objavljenom radu, Juretić i suradnici proučavali su utjecaj veličine pora propusne membrane (0,4 µm i 3,0 µm) na varijabilnost barijere *in vitro* HCE-T modela (Juretić i sur., 2017). Stanice koje su nasađene na polikarbonatnoj membrani sa veličinom pora 3,0 µm migrirale kroz membranu, pa se stanični model sastojao od apikalnog lipofilnog HCE-T monosloja stanica i bazolateralnog lipofilnog sloja HCE-T monosloja migriranih stanica. Pri veličini pora od 0,4 µm nije opažena migracija stanica, ali opaženo je stvaranje višeslojnog epitela nakon izlaganja zraku. Stanični model pri čijem uzgoju su korištene membrane s veličinom pora od 3,0 µm je postigao bolja barijerna svojstva nego onaj pri čijem uzgoju su korištene membrane s veličinom pora od 0,4 µm.

Ekvivalenti rožnice *in vitro* izrađuju se tehnikom slojevitog uzgoja stanica koja uključuje uzgoj endotelnih stanica rožnice na poroznim sintetskim membranama, prekrivanje endotelnih stanica otopinom kolagena koja sadrži stanice strome rožnice i uzgoj epitelnih stanica rožnice na sloju kolagena. Uzgoj epitelnih stanica na površini otopina/zrak osigurava stvaranje čvrstih međustaničnih veza (Pepić i sur., 2012). Razvijeno je nekoliko ekvivalenata modela rožnice koji jako dobro oponašaju *in vivo* uvjete. Najveći uspjeh postigla je grupa profesora Reichla sa Sveučilišta u Braunschweigu, stvaranjem 3D modela ljudske rožnice temeljenog na HCE-T staničnoj liniji (Hahne i sur., 2012).

1.3.POLIMERI

Polimeri su tvari nastale međusobnim povezivanjem malih molekulskih jedinki ili monomera, koji se obično ponavljaju po nekom pravilu, u velike molekule. Dobivaju se reakcijama polimerizacije ili polikondenzacije. Polimere s obzirom na podrijetlo dijelimo na prirodne ili biopolimere, polusintetske, organske sintetske ili umjetne polimere i anorganske sintetske polimere (Duncan i Vicent, 2012).

Razvitak polimerne kemije dao je nebrojene mogućnosti variranja polimernog sintetskog materijala koji se upotrebljava za najrazličitije svrhe, a u farmaceutici je dao poseban doprinos razvitku terapijskih sustava. Izbor polimera za terapijske sustave od presudne je važnosti radi njihovih specifičnih svojstava (kao što su, molekulska masa, elastičnost, topljivost, razgradljivost, keliranje, bioadhezija, utjecaj na permeabilnost) koji omogućavaju pripremu polimernih sustava s produljenim i/ili kontroliranim oslobađanjem i učinkom (Jalšenjak, 2003; Duncan i Vicent, 2012).

1.3.1. Utjecaj viskoznosti polimernog sustava na bioraspoloživost

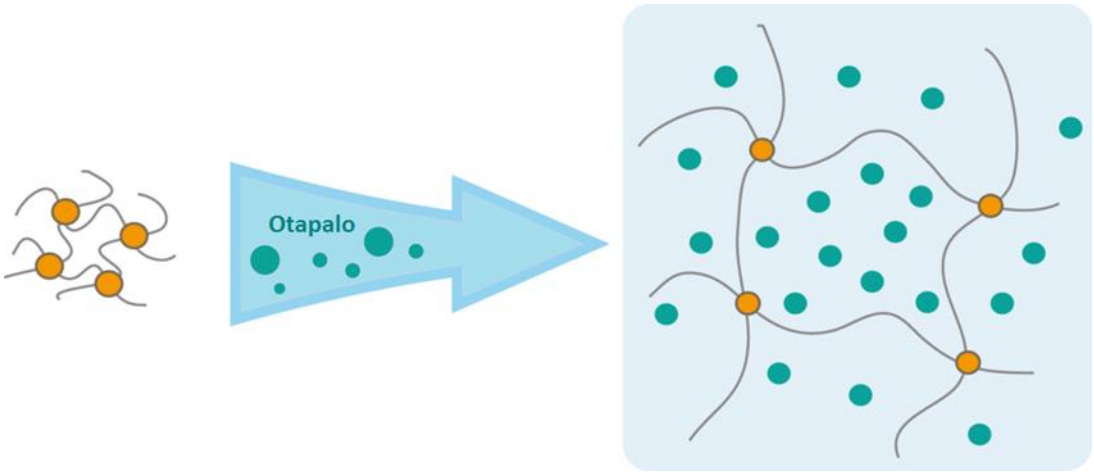
Polimerne otopine mogu se ponašati u skladu s Newtonovim ili Ne-Newtonovim sustavima (Pepić, 2004b). Viskoznost polimerne otopine mjera je otpora tečenju ili pokretanju, a zavisi o molekularnoj masi, koncentraciji, temperaturi i sili smicanja (Zignani i sur., 1995). Newtonovi sustavi su idealno viskozni sustavi kod kojih promjena sile ne uzrokuje promjenu dinamičke viskoznosti tijekom treptanja i fiksacije i stoga su slabije podnošljivi u oku. Ispod određene viskoznosti nema osobitog poboljšanja bioraspoloživosti, a iznad te mjere nema daljnjeg produljenja vremena dodira dok treptanje postaje bolno, što znači da postoji

ograničeni raspon viskoznosti koja poboljšava bioraspoloživost zadržavajući podnošljivost (Zignani i sur.,1995).

Ne-Newtonove sustave nazivamo još i realnima, a iskazuju nekoliko tipova tečenja, pseudoplastično, plastično, dilatantno i tiksotropno. Pseudoplastični sustavi su sustavi kod kojih prividna viskoznost opada djelovanjem sile. Zbog tih značajki pseudoplastični sustavi su zanimljiviji jer olakšavaju treptanje, a omogućuju uporabu visoko viskoznih pripravaka (Zignani i sur.,1995). Optimalno poboljšanje bioraspoloživosti osiguravaju pseudoplastični oblici s viskoznošću do 150 mPa s, dok oblici veće viskoznosti zamućuju vid (Pepić i sur., 2012). Suzni film prirodno pokazuje pseudoplastična svojstva, stoga je i pripravak pseudoplastičnih osobina prikladniji za primjenu zbog smanjivanja viskoznosti prilikom treptanja i stabiliziranja suznog filma u periodu između dva treptaja (Pepić, 2004b).

1.4.HIDROGELOVI

Vodene gelove čine hidrofilni, visokomolekularni, umreženi polimeri ili kopolimeri koji oblikuju trodimenzionalnu mrežu u vodi (Pepić, 2004b). Pokazuju svojstvo bubrenja i zadržavanja određene količine vode u svojoj strukturi, s tim da se ne otapaju u vodi. Sposobnost apsorpcije vode potječe od hidrofilnih funkcionalnih grupa (Ahmed, 2015).



Slika 4. Shematski prikaz bubrenja hidrogela dodatkom otapala (preuzeto s http://www.aip.nagoya-u.ac.jp/en/public/nu_research/highlights/detail/0001878.html).

Postoji širok raspon prirodnih, polusintetskih i sintetskih polimernih materijala koji se mogu koristiti za izradu hidrogelova (Kirchhof i sur., 2015). Kroz zadnja dva desetljeća, prirodni hidrogelovi postupno su zamijenjeni sintetskima, koji imaju dugi vijek trajanja, visoki kapacitet apsorpcije vode i veliku snagu geliranja, hidrofobni su po prirodi i kemijski snažniji u usporedbi s prirodnima (Ahmed, 2015).

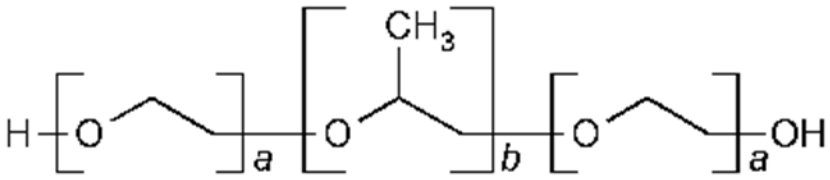
Razlikujemo sustave koji se oblikuju kao hidrogel te ne podliježu faznim prijelazima pri primjeni (*engl.* preformed gels) i sustave koji se oblikuju kao otopine ili suspenzije povećane viskoznosti, a gel nastaje faznim prijelazom tek pri primjeni zbog promjene fizičko-kemijskih svojstava na mjestu primjene (*engl. in situ* forming gels). Sustavi koji se oblikuju kao hidrogel građeni su od prirodnih, polusintetskih i sintetskih polimera (derivati celuloze, hijaluronska kiselina, polivinilalkohol, derivati poliakrilne kiseline). Pri oftalmičkoj primjeni, takvi gelovi ne mogu osigurati točno i reproducibilno doziranje djelatne tvari, često izazivaju zamućenje vida i prekomjerno izlučivanje suza (Pepić, 2004b).

1.4.1. *In situ* gelirajući sustavi

Novi formulacijski pristupi teže sjedinjenju prednosti otopine (točnost, reproducibilnost i jednostavnost doziranja) i gela (produljenje dodira s površinom oka). Otopine koje se primjenjuju kapanjem u oko, a pri fiziološkim uvjetima prelaze u gel fazu prihvatljivije su za bolesnika (Pepić, 2004b). Sposobnost poticanja *in situ* geliranja zbog promjene u okolini, vrlo je korisna pri oftalmičkoj primjeni lijeka jer može osigurati produljeno zadržavanje lijeka na površini oka. Prema poticajima iz okoline koji uzrokuju promjene u organizaciji polimernih molekula te nastajanje gela, polimeri mogu biti klasificirani u tri glavne grupe: termoreverzibilni polimeri, polimeri čije geliranje je potaknuto promjenom pH te polimeri čije geliranje je potaknuto prisustvom određenih iona (Agrawal i sur., 2012; Almeida i sur., 2014).

1.4.2. Poloksameri

Poloksameri su neionski amfifilni triblok kopolimeri sastavljeni od hidrofobnog polipropilenoksid (PPO) središnjeg bloka omeđenih sa dva hidrofilna polietilenoksid (PEO) bloka, a budući da njihove otopine karakterizira termoreverzibilni fazni prijelaz, koriste se za razvoj *in situ* gelirajućih sustava (Kirchhof i sur., 2015).

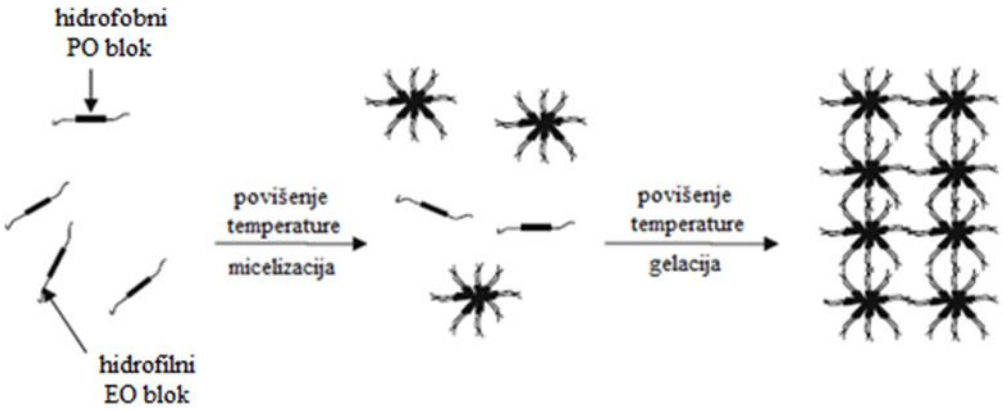


Slika 5. Strukturni prikaz poloksamera.

Površinski su aktivne tvari, stvaraju micele u vodenim otopinama, a pri visokim koncentracijama micele se gusto pakiraju te nastaje gel. Različiti poloksameri razlikuju se samo u relativnoj količini propilen- i etilenoksida koji su dodani tijekom proizvodnje. Korišteni su u različitim oralnim, parenteralnim i topikalnim farmaceutskim oblicima i generalno su smatrani sigurnim pomoćnim tvarima (*engl.* generally recognized as safe, GRAS) (Rowe i sur., 2009a). Njihove otopine i gelovi su prozirni, ne interferiraju sa normalnim vidom i stoga su prikladni za primjenu u oftalmologiji (Al Khateb i sur., 2016). Komercijalno su dostupni pod trgovačkim nazivima poput Pluronic, Synperonic i Tetronic u čvrstom, polučvrstom i tekućem obliku.

Poloksamer 407 (P407), poznat pod zaštićenim imenom Pluronic F127, sadrži približno 70% etilenoksida što pridonosi njegovoj hidrofilnosti. Vodena otopina P407 pri koncentraciji između 20-30% (*m/m*), reverzibilno se pretvara u bezbojni, transparentni gel na sobnoj i tjelesnoj temperaturi, koja ponovno postaje otopina pri nižim temperaturama (ispod 5°C) (El-Kamel, 2002; Almeida i sur., 2013). Zbog te značajke i niske toksičnosti P407, vrlo često se koristi u pripravi terapijskih sustava (Almeida i sur., 2013). Sastavni je dio nekih komercijalnih pripravaka za liječenje sindroma suhog oka zbog zaštite epitela rožnice i mukomimetičkih svojstava (Pepić, 2004b).

Termoreverzibilno ponašanje, oblikovanje bezbojnog i transparentnog gela mukomimetičkih svojstava čine ga interesantnim za potencijalnu primjenu u oftalmičkim terapijskim sustavima (Pepić, 2004). Njegovo prisustvo u formulaciji može rezultirati povećanom topljivošću slabo topljivih lijekova i produljenim oslobađanjem lijeka (Dumortier i sur., 2006).



Slika 6. Shematski prikaz organiziranja P407 kopolimera u micele u vodenoj otopini te geliranja povišenjem temperature (preuzeto i prilagođeno iz Dumortier i sur., 2006).

Međutim, nedostatak oftalmičkih pripravaka koji se temelje na P407 je visoka koncentracija polimera u formulaciji i mogućnost nastanka gela pri sobnoj temperaturi, zbog čega bi se pripravak trebao skladištiti pri niskim temperaturama (Wei i sur., 2002). Takve probleme nastoji se riješiti kombiniranjem P407 s drugim pomoćnim tvarima. Koncentracija poloksamera može se smanjiti dodatkom tvari koje povisuju viskoznost sustava, primjerice dodatkom metilceluloze, hidroksipropilmetilceluloze (HPMC) ili natrijeve karboksimetilceluloze (CMC Na) koji povećavaju bioadhezivnu prirodu gela i produljuju vrijeme zadržavanja u prekornealnom području. Kombinira se i sa Carbopolom 940, ksantan gumom i natrijevim alginatom čiji je sol-gel fazni prijelaz potaknut promjenom pH ili prisustvom iona kalcija (Almeida i sur., 2013). Dobri rezultati postignuti su kombinacijom različitih polimera u različitim koncentracijama, a najkorišteniji *in situ* gelirajući termoreverzibilni polimeri su P407 koncentracije 10-20% (*m/m*), P338 koncentracije 5-15% (*m/m*), P188 koncentracije 10-15% (*m/m*) i polimeri kojima je fazni prijelaz potaknut promjenom pH kao poliakrilna kiselina koncentracije 0,05-0,3% (*m/m*) i kitozan raspona koncentracije 0,1-0,3% (*m/m*) (Almeida i sur., 2013). Dodatak Poloksamera 188 (P188) rezultira povišenjem temperature geliranja te smanjenjem viskoznosti pri sobnoj temperaturi, a temperaturu prijelaza može proporcionalno sniziti i dodatak soli, što može utjecati na brzinu oslobađanja lijeka i njegovu difuziju kroz gel (Matanović i sur., 2013; Almeida i sur., 2013). Kombinacija P407 (21% (*m/m*)) i P188 (10% (*m/m*)) pokazala se kao optimalna za razvoj formulacije (Agrawal i sur., 2012).

Jedno od ograničenja formulacija koje se temelje na poloksamerima je nedovoljna mehanička čvrstoća, zbog čega dolazi do brze erozije gela nakon primjene. Dodatkom kitozana u takve formulacije, povećava se mehanička čvrstoća gela i produljuje vrijeme kontakta s površinom oka (Gratieri i sur., 2010).

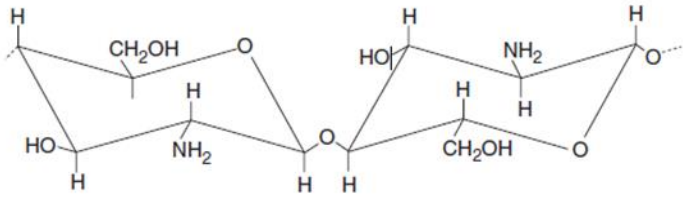
1.4.3. Sigurnost primjene P407 u oftalmičkim pripravcima

Primjena poloksamera u visokim koncentracijama (20-30% (*m/m*)) može uzrokovati osjećaj nelagode i iritaciju oka. Podnošljivost P407 ispitivana je na rožnici oka kunića i miša u volumenu 10 µl (ispitivanje na zečevima) i 1µl (ispitivanje na miševima) kroz 3 dana primjenom četiri puta dnevno (Furrer i sur., 2000). Pokazalo se da P407 ne ispoljava ništa štetniji učinak od fiziološke otopine.

Adriaens i suradnici (2005) su u svrhu istraživanja stupnja iritacije oka koristili kombinacije poloksamera P188 i P407 u različitim omjerima (0:20, 10:10, 20:0), a kao pozitivnu kontrolu koristili su benzalkonij klorid. Pokazalo se da izlaganje ovim formulacijama nije uzrokovalo značajno povećanje lučenja sluzi kao indikator iritacije, kao što je to prouzročilo izlaganje benzalkonij kloridu.

1.4.4. Kitozan

Kitozan je polikationski kopolimer građen od 2-amino-2-deoksi-D-glukoze i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukoze povezanih beta-1,4 glikozidnim vezama. Dobiven je djelomičnom alkalnom deacetilacijom hitina, glavnog strukturnog polisaharida beskralježnjaka i nižih biljaka. Netopljiv je u vodi, alkalnim i organskim otapalima, ali je topljiv u većini otopina organskih kiselina kada je pH otopine niži od 6.5.



Slika 7. Strukturni prikaz kitozana (preuzeto iz Başaran i Yazan, 2012.)

Njegova primjena je široka zahvaljujući svojstvima kao što su biokompatibilnost, netoksičnost i biorazgradljivost. Fizičko-kemijska svojstva kitozana poput čistoće, visokoznosti i stupnja deacetilacije ovise o raznim čimbenicima u procesu proizvodnje.

Otopine i hidrogelovi kitozana imaju pseudoplastična svojstva te im se viskoznost smanjuje povećanjem brzine smicanja. Zbog svoje velike molekularne mase i linearne nerazgranate strukture kitozan povećava viskoznost sustava u kiselom okruženju. Viskoznost otopina kitozana povećava se s povećanjem koncentracije kitozana, smanjenjem temperature i povećanjem stupnja deacetilacije (Rowe i sur., 2009b). Osjetljivost kitozana na pH omogućuje stvaranje hidrogelova koji bubre i oslobađaju sadržaj na određenim mjestim u probavnom sustavu ovisno o lokalnom pH (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Kitozan ima svojstvo bioadhezivnosti koje je posljedica interakcije između polimernih lanaca i makromolekula s površine sluznica. Pozitivno nabijene amino skupine kitozana stupaju u elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim mucinima sluznice što rezultira mukoadhezijom. To omogućuje dulje vrijeme dodira s epitelom rožnice preko kojeg se odvija prijenos lijeka prije nego što se lijek ukloni iz prekornealnog područja. Kitozan povećava transepitelnu permeabilnost zahvaljujući svojoj sposobnosti da reverzibilno otvara čvrste veze među stanicama (Hafner i sur., 2015). Zbog mukoadhezivnih i baktericidnih svojstava primjenjuje i u izradi mekih kontaktnih leća i otopina za leće, a djeluje i kao hemostatik, zbog čega se proučava njegova uloga kao potencijalno korisnog u zacijeljivanju akutnih i kroničnih rana (Nilsen-Nygaard i sur., 2015).

Kitozan se može naći u oftalmičkim formulacijama zajedno s poloksamerima zbog poboljšanja mehaničkih i mukoadhezivnih svojstava te produljenog vremena zadržavanja *in situ* gelirajućeg sustava (Gupta i sur., 2007; Varshosaz i sur., 2008; Gratieri i sur., 2010). Nakon primjene, polagano se razgrađuje u amino šećere koji se u potpunosti apsorbiraju (Başaran i Yazan, 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bioraspoloživost lijeka u oku je vrlo niska pri topikalnoj primjeni konvencionalnih kapi za oko zbog barijera prednjeg segmenta oka. Zbog porasta bolesti oka starenjem populacije, a koje ako se ne liječe adekvatno mogu rezultirati sljepoćom, raste potreba za razvojem inovativnih ljekovitih pripravaka koji bi osiguravali bolje prevladavanje barijera oka te poboljšanu bioraspoloživost lijeka u oku. Jedno od rješenja predstavljaju *in situ* gelirajući pripravci, čija glavno obilježje je produljenje zadržavanja pripravka na površini oka te posljedično bioraspoloživosti lijeka. Rožnica je vrlo osjetljivo tkivo te stoga postoje specifični zahtjevi za sigurnost primjene i velika ograničenja koncentracije polimera koji se mogu koristiti u oftalmičkim pripravcim. U razvoju *in situ* gelirajućih pripravaka koji se temelje na poloksamerima predlažu se vrlo visoke koncentracije tih polimera. Nije utvrđeno da P407 u koncentraciji od 20% (*m/m*) negativno utječe na rožnicu u životinja pri jednokratnoj primjeni. Međutim, mogući negativni učinci ne mogu se isključiti za veće ukupne koncentracije poloksamera, osobito u slučaju kronične primjene i/ili liječenja oštećene rožnice. Postoji velika vjerojatnost da se biokompatibilnost *in situ* gelirajućih pripravaka koji se temelje na visokim koncentracijama poloksamera neće moći ispitati *in vitro* korištenjem trenutno dostupnih staničnih modela. Stanični modeli epitela rožnice su naime još osjetljiviji od intaktnog tkiva rožnice *in vivo*. Stoga, pripravci koji ispolje negativni učinak na modelima *in vitro* ne moraju nužno biti toksični i u *in vivo* uvjetima. Nemogućnost ispitivanja biokompatibilnosti *in vitro* značajno otežava i poskupljuje razvoj *in situ* gelirajućih pripravaka.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost staničnih modela epitela rožnice u ispitivanju biokompatibilnosti *in situ* gelirajućih sustava koji se temelje na poloksamerima.

Specifični ciljevi diplomskog rada su ispitati biokompatibilnost *in situ* gelirajućih sustava temeljenih na poloksamerima P407 i P188 te kitozanu korištenjem:

• humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T

• *in vitro* modela rožnice temeljenog na dvosloju humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T

• *in vitro* modela rožnice temeljenog na višesloju humanih epitelnih stanica HCE-T

3. MATERIJALI I METODE

3.1.MATERIJALI

Prilikom izrade ovog diplomskog korišten je pufer balansiran Hankovim solima (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) koji je izrađen otapanjem 0,0463 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 0,0250 g $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,0250 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,1 g KCl, 0,015 g KH_2PO_4, 0,0875 g $NaHCO_3$, 2 g NaCl, 0,015 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, 0,275 g D-Glukoza monohidrata i 1,7875 g HEPES-a u 250 mL pročišćene vode. Koristeći 0,6M HCl početni pH podešen je sa 6,33 na 6,0.

Ispitivana formulacija *in situ* gelirajućeg sustava sastoji se od poloksamera P407 (14,2%, *m*/*m*), P188 (17%, *m*/*m*) te kitozana (0,25%, *m*/*m*) .

3.2.METODE

3.2.1. Uvjeti uzgoja stanica

Korištena je stanična linija humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T (RIKEN Cell bank, Japan). Imortalizirane stanice uzgajaju se u tikvicama za uzgoj stanica u inkubatoru pri temperaturi 37°C, relativnoj vlažnosti zraka od 90% i s 5% CO2. Stanice rastu u hranidbenom mediju DMEM/F12 (Lonza, Švicarska) koji sadržava dimetil sulfoksid (0,5%, AppliChem GmbH, Njemačka), fetalni goveđi serum (5%, Biosera, Francuska), otopinu humanog inzulina (5 μg/mL, Sigma-Aldrich), epidermalni faktor rast (10 ng/mL, Sigma-Aldrich), penicilin/streptomicin/amfotericin B (Lonza). Svaka dva dana stanicama se mijenja medij. Kad se postigne konfluentnost stanica, potrebno je stanice podijeliti i osigurati im novu površinu za uzgoj. Najprije se odsiše medij u kojem su dosad stanice rasle, a potom se nježno ispire dodatkom HBSS. Disocijacija stanica sa površine na kojoj su uzgajane vrši se enzimatski, koristeći enzim tripsin. Pregledom na mikroskopu utvrđuje se da stanice poprimaju okrugli oblik te plutaju u mediju, što potvrđuje da su se stanice odvojile sa podloge. Potom se dodatkom medija koji sadrži serum inhibira aktivnost tripsina. Sadržaj iz tikvice se centrifugira pri brzini od 1200 rpm (Heraeus Megafuge 1.0). Supernatant se pipetira i odbacuje, a dodaje se svježi medij, te se nježnim pokretima homogenizira suspenzija stanica.

Broj stanica po mL određuje se brojanjem hemocitometrom. Stanice se nasađuju na ploče za uzgoj stanica.

3.2.2. Monosloj HCE-T

Stanična morfologija nasađenih stanica na ploči s 96 jažica pri gustoći 3000 stanica/jažici promatra se mikroskopom dok se ne postigne konfluentnost 80-90% u hranidbenom mediju. Uklanja se medij i stanice se ispiru stanica s PBS-om (Lonza), koji ima pH 7,4. Prije dodavanja 100 µL uzorka, uklanja se 100 µL medija i ispire jednom s 100 µL PBS-a. Stanice inkubirane sa 100 µL medija DMEM/F12, te 100 µL pufera HBSS (6,0 i 7,4) služe kao kontrola. Uzorci su rađeni u triplikatu. Inkubiraju se 5, 10, 15, 30 i 60 minuta na temperaturi od 37°C i 5% CO2 te dodatne 3 minute na sobnoj temperaturi, kako bi gel prešao u viskoznu otopinu radi lakšeg ispiranja. Uklanjaju se uzorci i ispire se jednom sa 100 µL PBS-a. Dodaje se 100 µL DMEM/F12 i stanice se inkubiraju 24 h.

3.2.3. *In vitro* model epitela rožnice

HCE-T stanice se nasađuju na polikarbonatnu membranu (Transwell, veličine pora 0,4 µm i 3,0 µm, promjera 12 mm, površine 1,12 cm^2; Corning Inc., SAD) koja je prethodno obložena kolagenom i fibronektinom. Isti postupak proveden je za stanice nasađene na membrane s porama veličine od 0,4 µm i 3,0 µm. Stanice se uzgajaju u mediju i mjeri se otpor kroz pet dana kad dolazi do naglog porasta u TEER vrijednosti nakon čega se sve jažice izlažu zraku tri dana radi poticanja diferencijacije (stanice nasađene na membranama s porama veličine od 0,4 µm i 3 µm) i stvaranja višeslojnog epitela (samo za stanice nasađene na membranama s porama veličine od 0,4 µm). Stanicama se prilikom izlaganja zraku umetnula metalna ploča kako bi se bazolateralni volumen povećao na 2000 µL. Osmi dan stanice su spremne za tretiranje. Dodaje se 500 µL DMEM/F12 u donorski odjeljak i mjeri se otpor. Stanice su ispiru sa 200 µL PBS-a i dodaje se 500 µL HBSS-a (pH 6,0) u donorski te 1500 µL u receptorski odjeljak, a potom se stanice inkubiraju 30 minuta i mjeri se otpor. Slijedi uklanjanje HBSS-a iz donorskog odjeljka i dodavanje 500 µL uzorka te inkubacija 30 minuta i dodatnih 3 minute na sobnoj temperaturi radi lakšeg ispiranja gela. Nakon mjerenja otpora stanice se ispiru s 200 µL PBS-a. U receptorski odjeljak dodaje se 2000 µL medija DMEM/F12 i slijedi izlaganje stanica zraku tijekom noći. Sutradan se dodaje 500 µL medija

(DMEM/F12) u donorski odjeljak, a iz receptorskog je oduzeto 500 µL i uklanja se metalna ploča. Slijedi inkubacija 30 minuta pri 37°C i mjerenje otpora.

3.2.4. Mjerenje transepitelnog električnog otpora

Kako bi se procijenila barijerna svojstva modela epitela rožnice tijekom uzgoja, ali također da bi se istražio utjecaj promjene uvjeta uzgoja na integritet epitela (Hahne i Reichl, 2011), mjeri se transepitelni električni otpor (*engl.* transepithelial electric resistance, TEER). Svakoj jažici u različitim fazama uzgoja, mjeren je otpor elektrodom (STX-2, WPI, SAD) tri puta, a vrijednost je očitana na voltmetru (EVOM, WPI, SAD).
Srednjoj vrijednosti tri mjerenja svake jažice oduzima se otpor same membrane i množi sa površinom membrane (1,12 cm^2). Dobiva se TEER vrijednost izražena u Ω cm^2, kao indikator integriteta i diferencijacije epitela.

3.2.5. MTT test

Stanična vijabilnost procjenjuje se MTT testom koji mjeri aktivnost mitohondrijskog enzima sukcinil-dehidrogenaze (Pauly, 2009). Stanične sukcinil-dehidrogenaze reduciraju MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazol bromid, AppliChem) u ljubičasto obojeni produkt formazan. Nastali spoj netopljiv je u vodi, ali topljiv u organskom otapalu kao što je izopropranol. Mjeri se apsorbancija izopropanolne otopine formazana pri 570 nm (1420 Multilabel counter Victor, Perkin Elmer, SAD). Apsorbancija formazana proporcionalna je broju metabolički aktivnih stanica (Pauly, 2009).

3.2.5.1. Ispitivanje citotoksičnosti na monosloju humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T

MTT test se izvodi 24 h nakon tretiranja stanica s uzorcima 5, 10, 15, 30 i 60 minuta. U svaku jažicu na 100 µL medija dodano je 10 µL MTT otopine konačne koncentracije 0,5 mg/mL. Uzorci se inkubiraju dva sata na 37°C. Nakon uklanjanja medija, dodaje se 100 µL izopropranola i miješa. Pipetira se 80 µL za mjerenje apsorbancije formazana na mikrotitarskim pločama (1420 Multilabel counter VICTOR3, Perkin Elmer, SAD).

3.2.5.2. Ispitivanje citotoksičnosti na *in vitro* modelu rožnice temeljenog na dvosloju i višesloju humanih epitelnih stanica HCE-T

Pri postizanju odgovarajućih TEER vrijednosti stanice su spremne za tretiranje uzorcima 30 minuta, a nakon 24 h inkubacije stanica u mediju određuje se citotoksičnost. Uklanja se medij iz donora i receptora, a dodaje se 700 µL otopine MTT-a konačne koncentracije 0,5 mg/mL u oba odjeljka te inkubira četiri sata pri 37°C. Nakon uklanjanja MTT otopine, formazan se otapa dodatkom izopropranola u volumenu 700 µL u oba odjeljka. Mjeri se apsorbancija na 570 nm koristeći mikrotitarski čitač ploča.

3.2.6. Obrada rezultata

Rezultati dobiveni u ovom ispitivanju prikazani su kao srednja vrijednost skupine +/- standardna devijacija (SD). Postotak metabolički aktivnih stanica određen je slijedećim jednadžbama:

a) monosloj humanih epitelnih stanica

$$\% = \frac{\bar{A}\ (stanice\ inkubirane\ HBSS - om)}{\bar{A}\ (stanice\ inkubirane\ DMEM/F12)} \times 100$$

$$\% = \frac{\bar{A}\ (stanice\ inkubiraneformulacijom)}{\bar{A}\ (stanice\ inkubirane\ DMEM/F12)} \times 100$$

b) *In vitro* model epitela rožnice

$$\% = \frac{\bar{A}\ (stanice\ inkubirane\ formulacijom)}{\bar{A}\ (stanice\ inkubirane\ HBSS - om)} \times 100$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pri razvoju lijeka, jedan od glavnih izazova je ispitivanje citotoksičnosti djelatnih tvari, pomoćnih tvari te formulacija (Elsheikh i sur., 2014). Najčešće se u tim ispitivanjima koriste 2D stanični modeli odnosno stanični monosloj na plastičnoj podlozi. Međutim, ti modeli lošije simuliraju situaciju *in vivo* u usporedbi s 3D modelima koji uključuju stanični višesloj na definiranoj podlozi (najčešće obloženoj proteinima izvanstaničnog matriksa) (Elsheikh i sur., 2014; Bhise i sur., 2014). Prednosti 3D modela postojanje je interakcija između stanica te stanica i izvanstaničnog matriksa te stoga ti modeli imaju potencijal premostiti jaz između tradicionalnih *in vivo* animalnih modela i 2D modela staničnih kultura (Elsheikh i sur., 2014). Njihova uloga u istraživanju i razvoju novih oftalmičkih lijekova je obećavajuća (Huhtala i sur., 2008).

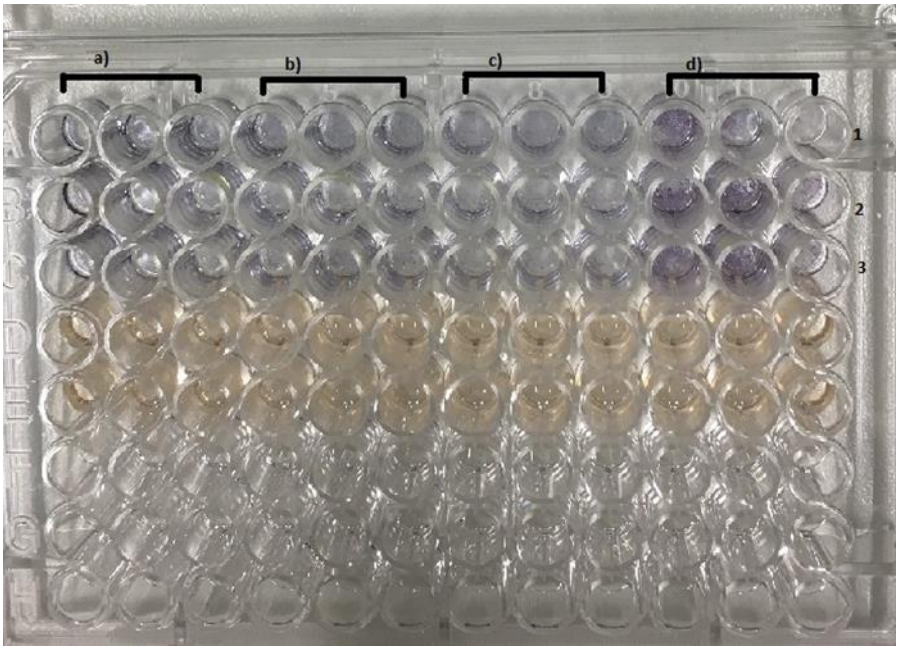
Citotoksičnost odnosno biokompatibilnost, se ispituje određujući vijabilnost stanica nakon tretiranja stanica s tvarima ili formulacijama od interesa. Vijabilnost stanica procjenjuje se određivanjem broja živih (vijabilnih) stanica različitim metodama.

Biokompatibilnost *in situ* gelirajućih sustava koji se temelje na poloksamerima P407 i P188 te kitozanu u ovom radu ispitana je korištenjem monosloja humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T te *in vitro* modela rožnice temeljenog na monosloju i višesloju HCE-T stanica. Kao metoda određivanja vijabilnosti stanica korišten je MTT test kojim se procjenjuje metabolička aktivnost stanica.

4.1. STANIČNA VIJABILNOST MONOSLOJA HUMANIH EPITELNIH STANICA ROŽNICE

Ispitivanje biokompatibilnosti *in situ* gelirajućeg sustava započeto je korištenjem monosloja HCE-T stanica. Očekuje se da će vrijeme zadržavanja *in situ* gelirajućeg sustava na površini oka biti značajno dulje u usporedbi s otopinom djelatne tvari. Gratieri i sur. u eksperimentu s kunićima su pokazali da je više od 60% uklopljene tvari *in situ* gelirajućeg sustava temeljenog na P407 i kitozanu zadržano na površini oka 10 minuta nakon primjene u usporedbi sa samo 15% djelatne tvari primjenjene u obliku otopine (Gratieri i sur., 2010). Stoga su stanice tretirane forumulacijom u trajanju od 5, 10, 15, 30 i 60 minuta. P407/P188/kitozan *in situ* gelirajući sustav karakterizira pH vrijednost od 6,0.

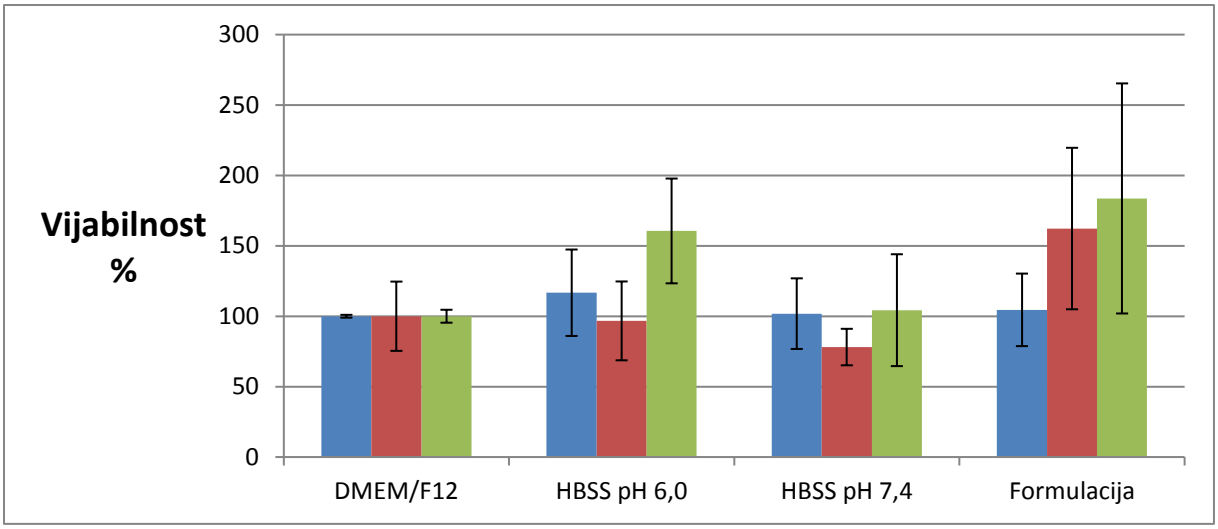
Pri pH vrijednosti nižoj od pKa kitozana (pH 6,5), kitozan je pozitivno nabijen i dolazi do izražaja njegova mukoadhezivnost. Optimalni pH za stanice rožnice je unutar područja od 6,5-8,5 (Shibata i sur., 2014). Kao kontrola u ovom ispitivanju korištene su stanice inkubirane u HBSS pH 6,0, HBSS pH 7,4 te staničnom hranidbenom mediju (DMEM/F12).



Slika 8. Monosloj humanih epitelnih stanica na ploči s 96 jažica tretiran je s P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućim sustavom (d) 5 (1), 10 (2) i 15 (3) minuta (n=3). Kontrole stanice su inkubirane medijem DMEM/F12 (a), HBSS pH 6,0 (b) i HBSS pH 7,4 (c). Nakon 24 h, proveden je MTT test.

Stanice već nakon 5 minuta inkubacije s formulacijom izgledaju drukčije. Monosloj je konfluentan, ali morfologija je promijenjena. Nakon tretiranja, stanice su isprane, dodan svježi medij, a MTT test proveden je 24 sata nakon tretiranja (slika 8).

Vijabilnost stanica izračunata je u odnosu na kontrolne stanice inkubirane DMEM/F12 medijem (vijabilnost 100%). Inkubacija stanica s puferom HBSS (pH 6,0 i 7,4) nije uzrokovala značajno smanjenje vijabilnosti stanica (slika 9). Tretiranje stanica formulacijom u trajanju od 5, 10 i 15 minuta također nije uzrokovalo značajnije promjene u vijabilnosti stanica u usporedbi s kontrolnim stanicama. Međutim, stanice nakon 30 i 60 minuta izlaganja formulaciji nisu bile vijabilne nakon 24 sata.

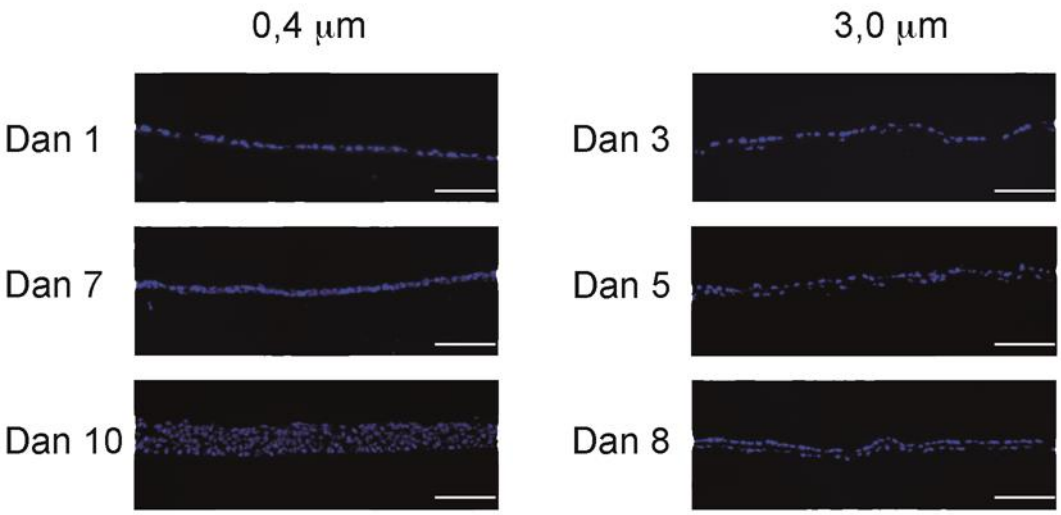


Slika 9. Vijabilnost monosloja humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T nakon tretiranja s P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućim sustavom. Vijabilnost stanica tretiranih s HBSS (pH 6,0 i 7,4) i formulacijom izražena je u odnosu na stanice inkubirane s DMEM/F12. Prikazane su srednje vrijednosti +/- SD (n=3). Plavi stupci označavaju inkubaciju stanica s DMEM/F12, HBSS pH (6,0 i 7,4) i formulacijom 5 minuta, crveni stupci 10 minuta, a zeleni stupci 15 minuta.

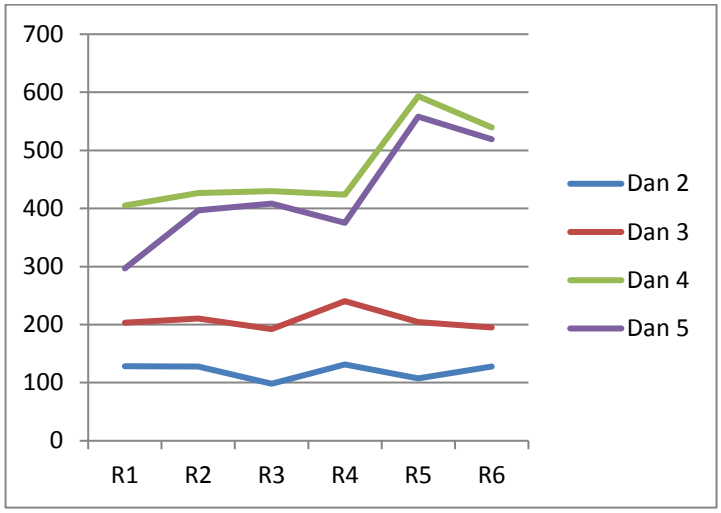
4.2.STANIČNA VIJABILNOST *IN VITRO* MODELA EPITELA ROŽNICE

Sljedeći korak je bio ispitivanje biokompatibilnosti P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućeg sustava korištenjem dva *in vitro* modela epitela rožnice. Uzgoj tih modela razlikuje se samo u veličini pora propusne membrane na kojoj rastu stanice (0,4 µm i 3,0 µm). Razlika u veličini pora rezultira vrlo različitih modelima pri čemu model uzgojen na porama veličine 3,0 µm se sastoji od sloja stanica s apikalne i bazolateralne strane (Juretić i sur., 2017). Model uzgojen na membrani s veličinom pora 0,4 µm karakterizira višesloj stanica samo s apikalne strane (slika 10). Modeli se uzgajaju 8 dana. TEER se mjeri tijekom uzgoja kroz pet dana, a vrijednosti su prikazane grafom (slika 11 i 12). Konfluentnost HCE-T stanica odražava se u naglom skoku TEER vrijednosti (Juretić i sur., 2017). Dobivene se vrijednosti dosta razlikuju i variraju od 300-500 Ω cm^2 za model s membranom veličine pora 0,4 µm i od 1000-2000 Ω cm^2 za model s membranom veličine pora 3,0 µm. Dosad objavljeni radovi govore o TEER vrijednostima čiji je raspon vrijednosti širok, a iznose 200-800 Ω cm^2 , 400 Ω cm^2, odnosno 1200 Ω cm^2 (Toropainen i sur., 2001; Reichl, 2008; Juretić i sur., 2017).

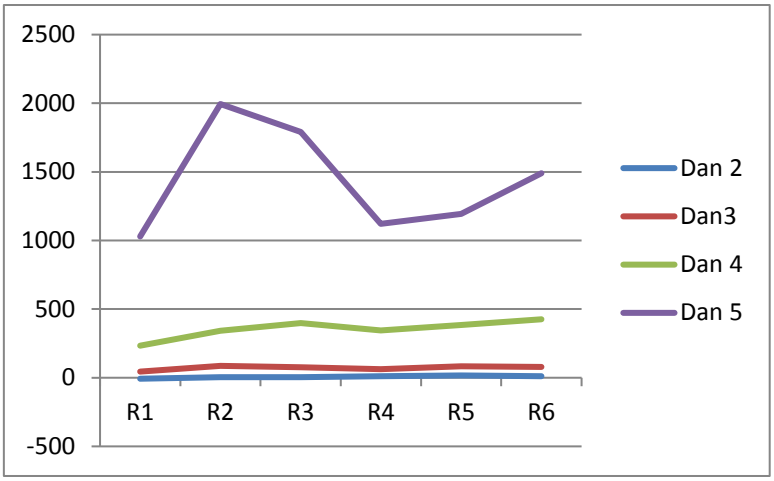
Nakon 5 dana modeli se izlažu zraku što potiče diferencijaciju stanica te stvaranje višesloja kod modela uzgojenog na membranama s veličinom pora od 0,4 μm.



Slika 10. Poprečni presjek in vitro modela epitela rožnice. Stanične jezgre obojane su bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (preuzeto iz Juretić i sur. 2017).



Slika 11. Izmjerene vrijednosti TEER-a kroz pet dana mjerenja tijekom uzgoja modela s veličinom pora membrane 0,4 μm.



Slika 12. Izmjerene vrijednosti TEER-a kroz pet dana mjerenja tijekom uzgoja modela s veličinom pora membrane 3,0 µm.

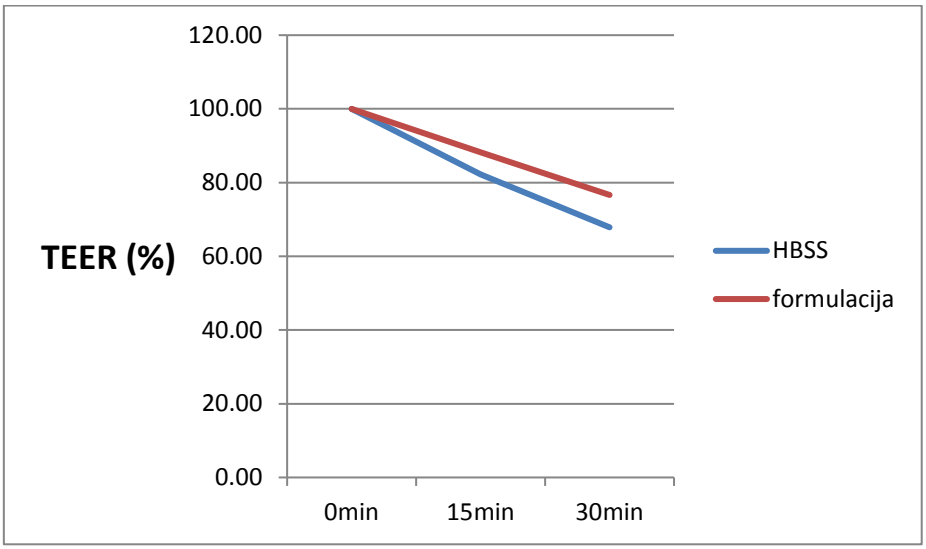
TEER je vrlo važan pokazatelj integriteta barijere, a može se pratiti i tijekom izlaganja stanica formulaciji. Na osnovu MTT testa provedenog na monosloju HCE-T stanica i s obzirom na očekivanu veću otpornost modela od monosloja stanica, odlučili smo stanice tretirati P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućim sustavom 30 minuta uz mjerenje otpora nakon 15 i 30 minuta. Kao kontrolni uzorak u ovom eksperimentu uzete su stanice izložene HBSS puferu pH 6,0.

Kod modela s veličinom pora membrane 0,4 µm na početku eksperimenta zabilježene su relativno niske vrijednosti TEER-a. Nakon 15 minuta, vrijednosti TEER-a za stanice tretirane formulacijom kreću od 113-87 Ω cm^2, dok za stanice tretirane HBSS puferom iznose 113-77 Ω cm^2. Nakon 30 minuta, vrijednosti TEER-a snizile su se na oko 80% vrijednosti TEER-a na početku eksperimenta. Nije bilo značajnije razlike između kontrolnih stanica i stanica tretiranih formulacijom.

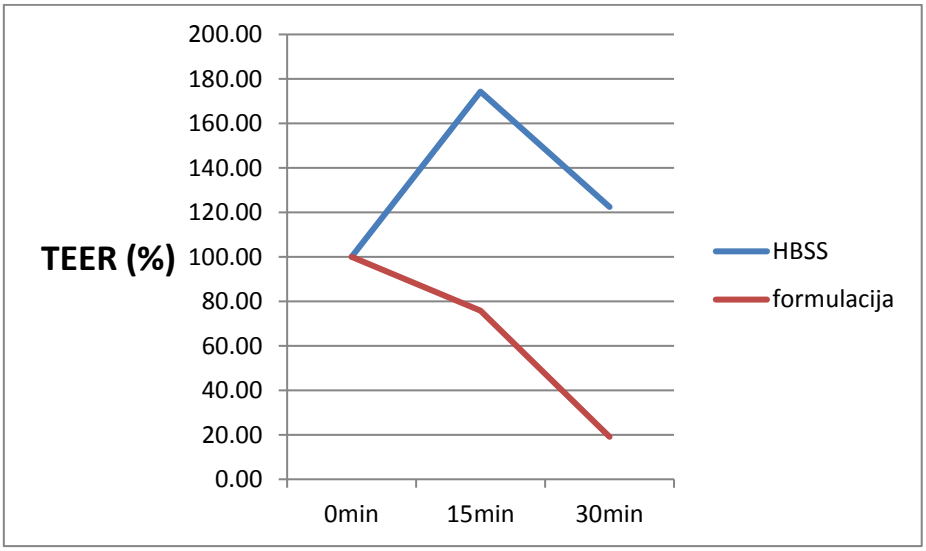
Kod modela s veličinom pora 3,0 µm, vrijednosti TEER-a izmjerene nakon 15 minuta tretiranja stanica formulacijom padaju neznatno, a nakon sljedećih 15 minuta bilježi se veći pad vrijednosti (slika 14). Vrijednosti izmjerene nakon tretiranja stanica puferom bilježile su porast nakon 15 minuta, a potom pad kroz idućih 15 minuta.

Smatra se da primjerena *in vitro* barijera ima vrijednosti TEER-a između 400 i 800 Ω × cm^2 (Pepić i sur., 2012) pa bismo mogli reći da se u slučaju modela s veličinom pora 3,0 µm nakon 15 minuta tretiranja formulacijom održala primjerena epitelna barijera koja ipak postaje

sve slabija nakon idućih 15 minuta. Razlog smanjenju TEER objašnjavamo prisutošću kitozana u formulaciji čiji učinak na otvaranje čvrstih veza je poznat (Hafner i sur., 2015). Model (0,4 µm) pokazuje slaba barijerna svojstva već nakon 15 minuta tretiranja formulacijom, ali i puferom.

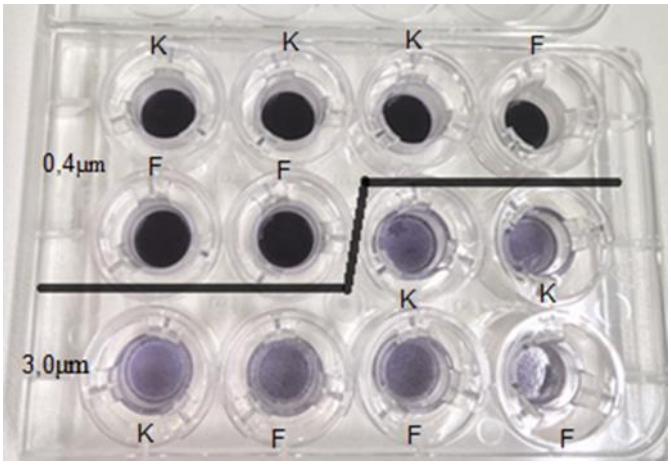


Slika 13. Vrijednosti TEER-a modela uzgojenog na membrani veličine pora 0,4 µm tijekom izlaganja P407/P1988/kitozan *in situ* gelirajućem sustavu.



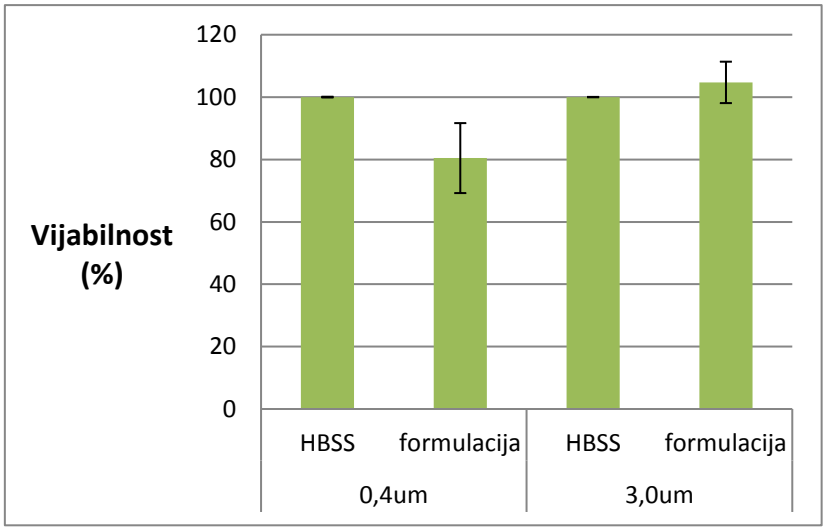
Slika 14. Vrijednosti TEER modela uzgojenog na membrani veličine pora 3,0 µm tijekom izlaganja P407/P1988/kitozan *in situ* gelirajućem sustavu**.**

Nakon 30 minuta formulacija je uklonjena, stanice isprane puferom te opet izložene zraku. 24 sata nakon tretiranja proveden je MTT test (slika 15).



Slika 15. MTT test je proveden 24 h nakon tretiranja HCE-T modela (0,4 µm i 3,0 µm) s P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućim sustavom (F). Kontrolne stanice izložene su HBSS puferu pH 6,0 (K).

Vijabilnost stanica izračunata je u odnosu na kontrolne stanice inkubirane HBSS puferom pH 6,0 (vijabilnost 100%). Iz rezultata prikazanih slikom 16, razvidno je da tretiranje *in vitro* modela epitela rožnice P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućim sustavom u trajanju od 30 minuta nije uzrokovalo značajnije promjene u vijabilnosti stanica u usporedbi s kontrolnim stanicama.



Slika 16. Utjecaj P407/P188/kitozan *in situ* gelirajućeg sustava na vijabilnost *in vitro* modela epitela rožnice. Vijabilnost stanica tretiranih formulacijom je izražena u odnosu na stanice tretirane s HBSS puferom pH 6,0. Prikazane su srednje vrijednosti +/- SD (n=3).

5. ZAKLJUČCI

- Ispitana je biokompatibilnost *in situ* gelirajućeg sustava namijenjenog oftalmičkoj primjeni koji se sastoji od poloksamera P407 (14,2%, *m/m*), P188 (17%, *m/m*) i kitozana (0,25 %, *m/m*) korištenjem tri različita stanična modela koji se temelje na imortaliziranim humanim epitelnim stanicama rožnice HCE-T.
- Vijabilnost stanica nakon tretiranja određena je mjerenjem metaboličke aktivnosti HCE-T stanica.
- Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju monosloja HCE-T stanica *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 5, 10 i 15 minuta.
- *In vitro* model epitela rožnice omogućio je određivanje utjecaja kitozana prisutnog u *in situ* gelirajućem sustavu na otvaranje čvrstih veza između epitelnih stanica rožnice mjerenjem transepitelnog električnog otpora (TEER).
- Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju *in vitro* modela epitela rožnice *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 30 minuta.
- *In vitro* modeli epitela rožnice pokazali su se manje osjetljivim u usporedbi s monoslojem stanica te su stoga prikladniji modeli u ispitivanju citotoksičnosti oftalmičkih formulacija u razvoju.

6. LITERATURA

Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm*, 2016, 502, 70-79.

Agrawal AK, Das M, Jain S. *In situ* gel systems as "smart" carriers for sustained ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9, 383-402.

Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*, 2015, 6, 105-121.

Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm*, 2016, 502, 70-79.

Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Sousa Lobo JM. Applications of poloxamers in ophthalmic pharmaceutical formulations: an overview. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10, 1223-1237.

Almeida, H., Amaral, M.H., Lobão, P., & Lobo, J.M. In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discov Today*, 2014, 19, 400-12.

Başaran E, Yazan Y. Ocular application of chitosan. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9, 701-712.

Bhise NS, Ribas J, Manoharan V, et al. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *J Control Release*, 2014, 190, 82-93.

Duncan R, Vicent MJ. Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65, 60-70.

Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*, 2006, 23, 2709-2728.

Ekelund K, Östh K, Påhlstorp C, Björk E, Ulvenlund S, Johansson F. Correlation between epithelial toxicity and surfactant structure as derived from the effects of polyethyleneoxide surfactants on Caco-2 cell monolayers and pig nasal mucosa. *J Pharm Sci*, 2005, 94, 730-744.

El-Kamel AH. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *Int J Pharm*, 2002, 241, 47-55.

Elsheikh MA, Elnaggar YSR, Abdallah OY. Rationale employment of cell culture versus conventional techniques in pharmaceutical appraisal of nanocarriers. *J Control Release*, 2014, 194, 92-102.

Furrer P, Plazonnet B, Mayer JM, Gurny R. Application of in vivo confocal microscopy to the objective evaluation of ocular irritation induced by surfactants. *Int J Pharm*, 2000, 207, 89-98.

Gratieri T, Gelfuso GM, Rocha EM, Sarmento VH, de Freitas O, Lopez RFV. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75, 186-193.

Gupta H, Jain S, Mathur R, Mishra P, Mishra AK, Velpandian T. Sustained Ocular Drug Delivery from a Temperature and pH Triggered Novel *In Situ* Gel System. *Drug Deliv*, 2007, 14, 507-515.

Hafner A, Lovrić J, Romić MD, et al. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 75, 142-150.

Hahne M, Reichl S. Development of a serum-free human cornea construct for *in vitro* drug absorption studies: The influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics. *Int J Pharm*, 2011, 416, 268-279.

Hoffman HM, Choi JH, Clousing DP, Ubels JL, McCarey BE, Edelhauser HF. Corneal epithelial testing strategies for safety evaluation of ophthalmic formulations. *Cutan Ocul Toxicol*, 2007, 26, 311-327.

Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60, 207-225.

Huhtala A, Salminen L, Tähti H, Uusitalo H. Corneal Models for the Toxicity Testing of Drugs and Drug Releasing Materials, 2008 *Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices,*(e-book), urednik N Ashammakhi.

Juretić M, Jurišić Dukovski B, Krtalić I, et al. HCE-T cell-based permeability model: A well-maintained or a highly variable barrier phenotype? *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104, 23-30.

Kirchhof S, Goepferich AM, Brandl FP. Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95, 227-238.

Matanović MR, Kristl J, Grabnar PA. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm*, 2014, 472, 262-275.

Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers (Basel)*, 2015, 7, 552-579.

Pauly A, Meloni M, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Baudouin C. Multiple endpoint analysis of the 3D-Reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: Early detection of toxic damage. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50, 1644-1652.

Pepić, I., Problemi lokalne primjene pripravaka za oči, *Farm Glas*, 2004a, 60, 311-329

Pepić I., Novi sustavi za primjenu lijeka u oko, *Farm Glas*, 2004b, 60, 523-539

Pepić I., Hafner A., Lovrić J., Filipović-Grčić J.: Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku, *Farm Glas*, 2012, 68, 177-205

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.

Ranta VP, Laavola M, Toropainen E, Vellonen KS, Talvitie A, Urtti A. Ocular pharmacokinetic modeling using corneal absorption and desorption rates from in vitro permeation experiments with cultured corneal epithelial cells. *Pharm Res*, 2003, 20, 1409-1416.

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

Reichl S. Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60, 299-307.

Rowe CR, Sheskey PJ, Weller PJ. Poloxamer. U: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, London, Chicago, 2009a, str. 506-509.

Rowe CR, Sheskey PJ, Weller PJ. Chitosan. U: Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, London, Chicago, 2009b, str. 159-162.

Senjković, R.Osnove oblikovanja lijekova. Zagreb, Školska knjiga, 2003, str.83

Shibata Y, Tanaka Y, Tomita T, et al. Evaluation of corneal damage caused by iodine preparations using human corneal epithelial cells. *Jpn J Ophthalmol*, 2014, 58, 522-527.

Toropainen E, Ranta VP, Talvitie a, Suhonen P, Urtti a. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42, 2942-2948.

Varshosaz J, Tabbakhian M, Salmani Z. Designing of a Thermosensitive Chitosan/Poloxamer In Situ Gel for Ocular Delivery of Ciprofloxacin. *Open Drug Deliv J*, 2008, 2, 61-70.

Zignani M, Tabatabay C, Gurny R. Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16, 51-60.

Wei G, Xu H, Ding PT, Li SM, Zheng JM. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: The rheological and gamma scintigraphic studies. *J Control Release*, 2002, 83, 65-74.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Bioraspoloživost lijeka u oku je vrlo niska pri topikalnoj primjeni konvencionalnih kapi za oko zbog brze eliminacije djelatne tvari s površine oka. Glavna karakteristika *in situ* gelirajućih sustava je produljenje zadržavanja pripravka na površini oka te posljedično povećanje bioraspoloživosti lijeka. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost staničnih modela epitela rožnice u ispitivanju biokompatibilnosti *in situ* gelirajućih sustava koji se temelje na poloksamerima i kitozanu. U tu svrhu korištena je imortalizirana stanična linija humanih epitelnih stanica rožnice, HCE-T, te *in situ* gelirajući sustav koji se sastoji od poloksamera P407 (14,2%, *m/m*), P188 (17%, *m/m*) te kitozana (0,25 %, *m/m*).

Citotoksičnost *in situ* gelirajućeg sustava ispitivana je na monosloju humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T te na *in vitro* modelima rožnice temeljenih na dvosloju i višesloju humanih epitelnih stanica HCE-T. Nakon tretiranja stanica s formulacijom, stanična vijabilnost procjenjivala se MTT testom. Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju monosloja HCE-T stanica *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 5, 10 i 15 minuta. *In vitro* model epitela rožnice omogućio je određivanje utjecaja kitozana prisutnog u *in situ* gelirajućem sustavu na otvaranje čvrstih veza između epitelnih stanica rožnice mjerenjem transepitelnog električnog otpora. Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju *in vitro* modela epitela rožnice *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 30 minuta. *In vitro* modeli epitela rožnice pokazali su se manje osjetljivim u usporedbi s monoslojem stanica te su stoga prikladniji modeli u ispitivanju citotoksičnosti *in situ* gelirajućih formulacija u razvoju.

When conventional eye drops are applied topically, the bioavailability of the drug in the eye is very low due to the rapid elimination of the active substance. The main characteristic of *in situ* gelling systems is the prolongation of the retention time on the surface of the eye and consequently the increase in the bioavailability of the drug. The aim of this diploma thesis was to investigate the suitability of *in vitro* corneal epithelial models for the evaluation of the biocompatibility of *in situ* gelling system that are based on poloxamers and chitosan. For this purpose, the immortalized corneal epithelial cell line, HCE-T, and an *in situ* gel system consisting of P407 (14,2%, *m/m*), P188 (17%, *m/m*) and chitosan (0,25%, *m/m*) were used.

The cytotoxicity of the *in situ* gelling system was investigated on a monolayer of a human corneal epithelial cell line, HCE-T and on *in vitro* corneal models based on bilayer and multilayer of HCE-T cells. After treating cells with the formulation, cell viability was evaluated by MTT test. The cytotoxic effect was not observed after a monolayer of HCE-T cells was exposed to the *in situ* gel system for 5, 10 and 15 minutes. The *in vitro* corneal epithealial model enabled the determination of the influence of chitosan present in the *in situ* gel system on the opening of tight junctions between the corneal epithelial cells by measuring the transepithelial electric resistance. The cytotoxic effect was not observed during the 30-minute exposure of the *in vitro* corneal epithelial models to the *in situ* gelling system. *In vitro* corneal epithelial models proved less sensitive in comparison to monolayer cells and are, therefore, more suitable models for studying cytotoxicity of the *in situ* gelling formulations.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Prikladnost *in vitro* modela rožnice za ispitivanje biokompatibilnosti oftalmičkih *in situ* gelirajućih sustava

Mirta Nenadić

SAŽETAK

Bioraspoloživost lijeka u oku je vrlo niska pri topikalnoj primjeni konvencionalnih kapi za oko zbog brze eliminacije djelatne tvari s površine oka. Glavna karakteristika *in situ* gelirajućih sustava je produljenje zadržavanja pripravka na površini oka te posljedično povećanje bioraspoloživosti lijeka. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati prikladnost staničnih modela epitela rožnice u ispitivanju biokompatibilnosti *in situ* gelirajućih sustava koji se temelje na poloksamerima i kitozanu. U tu svrhu korištena je imortalizirana stanična linija humanih epitelnih stanica rožnice, HCE-T, te *in situ* gelirajući sustav koji se sastoji od poloksamera P407 (14,2%, *m/m*), P188 (17%, *m/m*) te kitozana (0,25 %, *m/m*).Citotoksičnost *in situ* gelirajućeg sustava ispitivana je na monosloju humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T te na *in vitro* modelima rožnice temeljenih na dvosloju i višesloju humanih epitelnih stanica HCE-T. Nakon tretiranja stanica s formulacijom, stanična vijabilnost procjenjivala se MTT testom. Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju monosloja HCE-T stanica *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 5, 10 i 15 minuta. *In vitro* model epitela rožnice omogućio je određivanje utjecaja kitozana prisutnog u *in situ* gelirajućem sustavu na otvaranje čvrstih veza između epitelnih stanica rožnice mjerenjem transepitelnog električnog otpora. Citotoksični učinak nije zabilježen pri izlaganju *in vitro* modela epitela rožnice *in situ* gelirajućem sustavu tijekom 30 minuta. *In vitro* modeli epitela rožnice pokazali su se manje osjetljivim u usporedbi s monoslojem stanica te su stoga prikladniji modeli u ispitivanju citotoksičnosti *in situ* gelirajućih formulacija u razvoju.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 16 grafičkih prikaza i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *In situ* gelirajući sustavi, oftalmička primjena, citotoksičnost, HCE-T, kitozan, Pluronic F127, Pluronic F68

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

The suitability of *in vitro* corneal epithelial model for studying the biocompatibility of ophthalmic *in situ* gelling systems

Mirta Nenadić

SUMMARY

When conventional eye drops are applied topically, the bioavailability of the drug in the eye is very low due to the rapid elimination of the active substance. The main characteristic of *in situ* gelling systems is the prolongation of the retention time on the surface of the eye and consequently the increase in the bioavailability of the drug. The aim of this diploma thesis was to investigate the suitability of *in vitro* corneal epithelial models for the evaluation of the biocompatibility of *in situ* gelling system that are based on poloxamers and chitosan. For this purpose, the immortalized corneal epithelial cell line, HCE-T, and an *in situ* gel system consisting of P407 (14,2%, *m/m*), P188 (17%, *m/m*) and chitosan (0,25%, *m/m*) were used.

The cytotoxicity of the *in situ* gelling system was investigated on a monolayer of a human corneal epithelial cell line, HCE-T and on *in vitro* corneal models based on bilayer and multilayer of HCE-T cells. After treating cells with the formulation, cell viability was evaluated by MTT test. The cytotoxic effect was not observed after a monolayer of HCE-T cells was exposed to the *in situ* gel system for 5, 10 and 15 minutes. The *in vitro* corneal epithealial model enabled the determination of the influence of chitosan present in the *in situ* gel system on the opening of tight junctions between the corneal epithelial cells by measuring the transepithelial electric resistance. The cytotoxic effect was not observed during the 30-minute exposure of the *in vitro* corneal epithelial models to the *in situ* gelling system. *In vitro* corneal epithelial models proved less sensitive in comparison to monolayer cells and are, therefore, more suitable models for studying cytotoxicity of the *in situ* gelling formulations.

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

Thesis includes: 32 pages, 16 figures and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *In situ* gel systems, ophtalmic application, cytotoxicity, HCE-T, chitosan, Pluronic F127, Pluronic F68

Mentor: **Jasmina Lovrić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasmina Lovrić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
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

The thesis was accepted: July 2017.