

# Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku

---

Pepić, Ivan; Lovrić, Jasmina; Hafner, Anita; Filipović-Grčić, Jelena

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2012, 68, 177 - 205**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:027483>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku

**IVAN PEPIĆ, ANITA HAFNER, JASMINA LOVRIĆ, JELENA FILIPOVIĆ-GRČIĆ**

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

## UVOD

Generički lijek mora sadržavati istu ljekovitu tvar u istoj dozi i ljekovitom obliku koja se primjenjuje istim načinom primjene kao i originalni lijek. Bioraspoloživosti generičkog i originalnog lijeka moraju biti slične, odnosno mora se osigurati sličan profil ovisnosti koncentracije lijeka u krvi u vremenu čime se postiže jednaki terapijski učinak. Oftalmičkim pripravcima dosta čimbenika određuje bioraspoloživost lijeka u oku, a koncentracija lijeka u krvi u pravilu ne govori dovoljno o njegovoj intraokularnoj koncentraciji i terapijskom učinku. S obzirom da se generičkom pripravku ne zahtijevaju jednake pomoćne tvari u usporedbi s originalnim pripravkom, takvi se pripravci često od originalnih pripravaka razlikuju u vrsti i udjelu pomoćnih ljekovitih tvari. Učinak je pomoćnih tvari često presudan za bioraspoloživost lijeka iz oftalmičkog pripravka, jer se pripravak primjenjuje izravno na površinu oka preko koje se lijek apsorbira do mjesta terapijskog učinka.

Bioraspoloživost lijeka nakon oftalmičke primjene usko je povezana s njegovim biofarmaceutskim svojstvima (npr. topljivost u tekućinama oka i prekornealnog područja, permeabilnost kroz biološke barijere oka, metabolička stabilnost). Svojstva permeabilnosti lijeka kritična su za predviđanje njegove apsorpcije i bioraspoloživosti nakon oftalmičke primjene. Poznavanje permeabilnosti lijeka osobito je važno za generičke oftalmičke pripravke, jer druge i/ili pomoćne tvari promijenjenog udjela u generičkom pripravku utječu na permeabilnost lijeka. Izotoničnost, konzervansi, pH, indeks refrakcije, površinska napetost i viskoznost generičkog proizvoda značajno utječu na permeabilnost oftalmika. Dobra podnošljivost pripravka na površini oka također utječe na bioraspoloživost lijeka. Preparati koji su neugodni pri primjeni potiču suženje i treptanje zbog čega se lijek uklanja s mjesta apsorpcije čime se smanjuje vrijeme permeacije preko barijera oka. Neprimjerena toničnost oftalmičkog pripravka na površini oka stvara osmotski gradijent zbog čega se epitelne stanice spojnice dehidriraju što mijenja svojstva permeabilnosti barijere oka. Udjel konzervansa (npr. benzalkonijevog klorida) u pripravku značajno mijenja permeabilnost

lijeka, a moguće utječe i na sigurnost primjene pripravka. Optimalan je pH oftalmičkog pripravka 7,2. U slučajevima kada se pH mora podrediti drugim farmaceutsko-tehnološkim zahtjevima (npr. topljivost lijeka) puferski kapacitet suzne tekućine relativno dobro održava pH unutar fizioloških vrijednosti pa se pripravci širokog pH raspona (npr. nepuferirani proizvodi pH < 4,0 ili pH > 8,0) relativno dobro podnose na površini oka. Indeks refrakcije pripravka treba biti što sličniji indeksu refrakcije suzne tekućine i rožnice (1,34–1,36) da pripravak pri primjeni ne ometa vid. Pripravci površinske napetosti niže od površinske napetosti suzne tekućine (40–50 mN/m) dobro se rasprostiru po rožnici i miješaju s prekornealnim suznim filmom što poboljšava dodir pripravka i površine oka, odnosno permeabilnost lijeka. Oblici relativno niskih viskoznosti poput oftalmičkih otopina (najčešće 20 mPa s) dobro se podnose i istodobno brzo uklanjaju s površine oka što rezultira lošom bioraspoloživošću lijeka (1). Optimalno poboljšanje bioraspoloživosti osiguravaju pseudoplastični oblici s viskoznošću do 150 mPa s. Oblici veće viskoznosti zamućuju vid i pružaju otpor gibanju vjeđa pri treptanju te su manje učinkoviti u smanjivanju nazolakrimalne drenaže i stabiliziranju suznog filma (2).

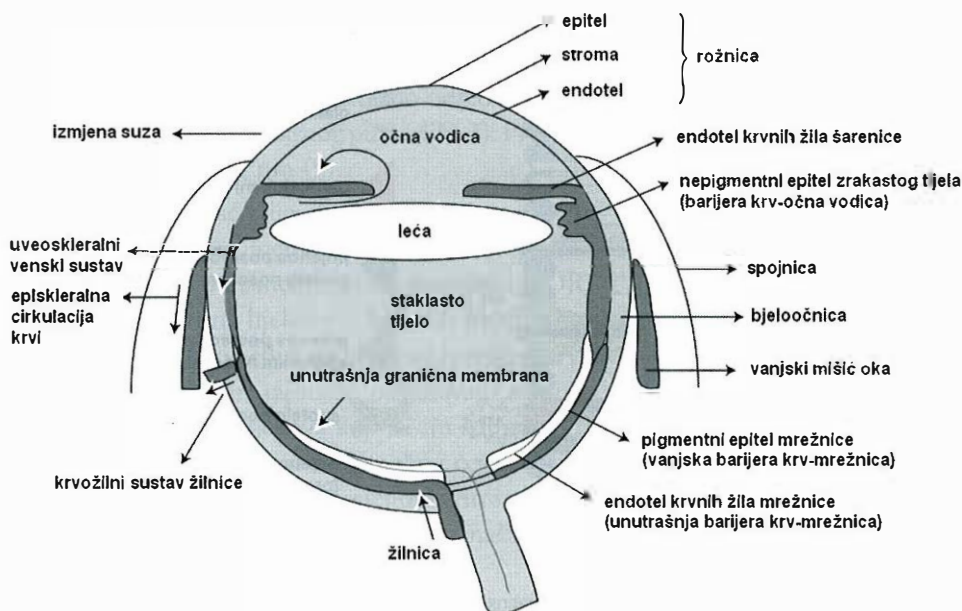
Neklinička probirna (*screening*) ispitivanja permeabilnost lijeka omogućuju predviđanje bioraspoloživosti lijeka u ranim fazama razvoja oftalmičkog pripravka. Pri probirnim ispitivanjima permeabilnosti rabe se različiti *in vitro* i *ex vivo* modeli bioloških barijera oka. Probirna ispitivanja permeabilnosti oftalmičkog pripravka trebaju biti: (i) velikog kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka (*high-throughput assay*), (ii) ekonomični i isplativi i (iii) relativno visoke sigurnosti predviđanja bioraspoloživosti lijeka nakon oftalmičke primjene.

U ovom su radu pregledno prikazani modeli *in vitro* i *ex vivo* bioloških barijera oka te ispitivanja farmakokinetike u oku na animalnim modelima *in vivo*. S obzirom da je tržište oftalmičkih lijekova usmjereno na proizvode u obliku kapi koji se primjenjuju na površinu prednjeg dijela oka, modeli barijera prednjeg dijela oka naglašeni su ovim radom. Zasižno niti jedan od opisanih modela barijera oka ne udovoljava u potpunosti zahtjevima farmaceutske industrije pa su svakom modelu istaknuti prednosti i nedostaci.

## BIOLOŠKE BARIJERE OKA

### Rožnica (*cornea*)

Nakon lokalne primjene pripravka na površinu oka većina se terapijski značajnih oftalmika (uglavnom male lipofilne molekule) apsorbiraju u oko preko rožnice (transkornealna apsorpcija). Površina je rožnice relativno mala (1,04 cm<sup>2</sup>). Apsorpcija je lijeka preko rožnice ograničena trima barijerama: vanjski lipofini epitel, središnja hidrofilna stroma i unutrašnji lipofilni endotel (slika 1.). Epitel rožnice ograničavajući je čimbenik intraokularne apsorpcije većine terapijski značajnih oftalmika (4).

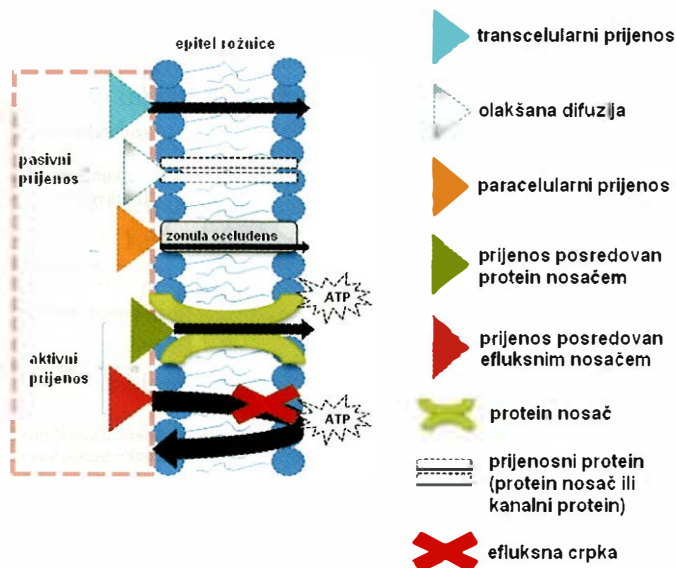


Slika 1. Biološke barijere oka [3].

### Epitel rožnice

Vanjski lipofilni epitel rožnice (debljina: 50–100  $\mu\text{m}$ ) višeslojan je (5–6 slojeva u sredini; 8–10 slojeva prema periferiji) i građen od tijesno priljubljenih skvamoznih stanica. Epitel nije orožnjen, a između epitelnih stanica granaju se ogranci cilijarnih živaca pa je rožnica osobito osjetljiva na bol. Epitel se rožnice regenerira i zato se pri ozljedi epitela ne stvaraju ožiljci niti rožnica gubi providnost. Prosječna je izmjena (*turnover*) epitela približno 1 sloj stanica dnevno. Ovaj sloj čini značajnu biološku prepreku (zaštitu) oka od vanjskih utjecaja. Čvrste veze među stanicama reguliraju prijenos hidrofilnih i/ili makromolekulskih tvari paracelularnim putem i čine selektivnu prepreku hidrofobnim molekulama. Lipofilni stanični slojevi prepreka su ionskom prijenosu (4).

Prijenos tvari kroz epitel rožnice odvija se pasivno i aktivno (slika 2.). Pasivni prijenos uključuje difuziju tvari niz koncentracijski gradijent (trancelularno ili paracelularno bez posredovanja proteina) ili olakšanu difuziju (posredovanjem proteina nosača ili kanalnih proteina). Aktivni prijenos tvari suprotno koncentracijskom gradijentu posredovan je proteinima nosačima ili uključuje aktivni prijenos tvari posredovan efluksnom crpkom. S obzirom na prijenos lijekova kroz epitel rožnice najčešće se razmatraju procesi pasivnog prijenosa (slika 2.). Paracelularni prijenos primarni je put pasivne difuzije iona. Određen je dimenzijama pora paracelularnog puta (3–5 nm) i fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka (molekulska masa, molekularni oblik;

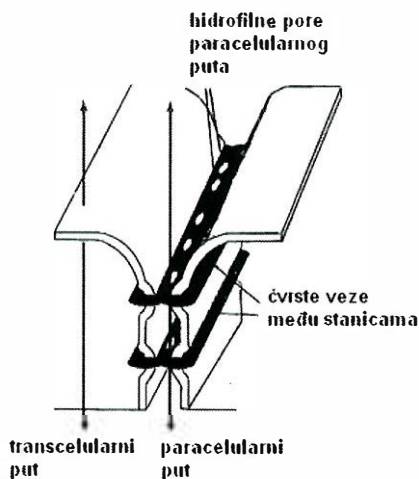


**Slika 2.** Mehанизmi prijenosa tvari kroz epitel rožnice (5).

molekulske dimenzije i fleksibilnost proteinske molekule). Čvrste veze među stanicama (*zonula occludens – tight junctions*) ograničavajući su čimbenik prijenosa paracelularnim putem, dok druge strukture paracelularnog puta (*zonula adherens, gap junction, desmosomi*) nisu prepreka prijenosu lijekova ovim putem. Paracelularni put daje prednost prijenosu hidrofilnih i/ili makromolekulskih lijekova. Za paracelularni se put također natječu ioni suzne tekućine kojima je izložena površina oka (5–7).

Pasivna difuzija niz koncentracijski gradijent transcelularnim putem ili olakšana difuzija prijenosnim proteinima (protein nosačima ili kanalnim proteinima) primarno daje prednost hidrofobnim lijekovima (5–7).

Osnovna svojstva koja određuju prijenos lijeka kroz epitel rožnice procesima pasivnog prijenosa su: (i) stupanj ionizacije koji određuje molekularni oblik lijeka (ionizirani ili neionizirani) u pH području suzne tekućine (7,3–7,7), (ii) lipofilnost lijeka koja se ogleda u koeficijentu razdiobe i (iii) naboj, oblik i veličina molekula lijeka. Primjerice, paracelularni prijenos pozitivno nabijenih hidrofilnih



**Slika 3.** Čvrste veze među stanicama (*tight junctions*) i hidrofilne pore paracelularnog puta (8).



tvari je veći u usporedbi sa sličnim tvarima suprotnog naboja jer je površina rožnice negativno nabijena pri fiziološkom pH suzne tekućine (5–7). Prijenos je električki neutralnih hidrofilnih tvari pretežno određen veličinom molekule koje mogu difundirati kroz pore paracelularnog puta (slika 3). Prosječni je polumjer pora paracelularnog puta epitela rožnice 2 nm (9).

U posljednje se vrijeme sve više ispituje prijenos lijekova posredovan efluksnom crpkom. Naime, na membranama stanica epitela rožnice i spojnice pronađeni su različiti efluksni transmembranski proteini (MDR1 P-glikoprotein, protein-2 višestruke otpornosti na lijekove – MDR2, protein otpornosti karcinoma dojke na lijekove – BCRP). Takvi efluksni proteini sprječavaju prijenos određenih tvari kroz epitel rožnice i spojnice i na taj način osiguravaju zaštitu oka. Istodobno, efluksni proteini sprječavaju prijenos lijekova koji su im supstrati. Primjerice, eritromicin je supstrat MDR2 i MDR1 P-glikoproteina zbog čega mu je relativno ograničen prijenos kroz epitel rožnice. Istodobnom primjenom eritromicina sa 6 $\alpha$ -metil-prednizolonom (inhibitor MDR2 i MDR1 P-glikoproteina) značajno se povećava koncentracija eritromicina u očnoj vodici (10, 11).

### *Stroma rožnice*

Središnja hidrofilna stroma rožnice (debljina: 300–500  $\mu\text{m}$ ; 90 % debljine rožnice) sastoji se od vlakana kolagena (kolagen tip VII usidruje stromu, a kolageni tipa I, III, V i VI složen je u listove) te stanica (fibrocita, keratinocita) bez kontinuirane strukture. Vlakna su kolagena složena u približno 200 listova paralelne orijentacije poput listova papira u knjizi. Debljina je svakog lista 1,5–2,5  $\mu\text{m}$ . Kolagen složen u listove pruža čvrstoću i optičku providnost. Stroma rožnice sadrži približno 85 % vode što je čini izrazito hidrofilnom. Ovaj je dio rožnice relativno propusna struktura, koja u normalnim uvjetima dopušta difuziju hidrofilnih tvari (4–6).

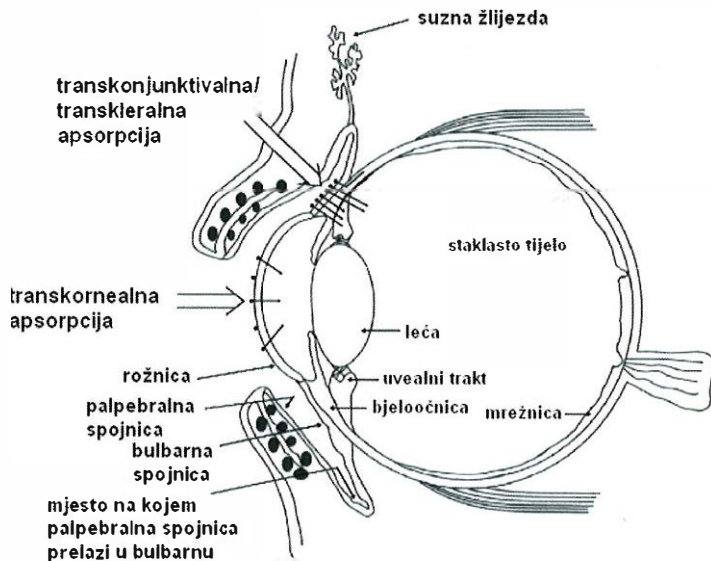
### *Endotel rožnice*

Unutrašnji lipofilni endotel (debljina: 5  $\mu\text{m}$ ) građen je od jednog reda skvamoznih ili kubičnih stanica bogatih mitohondrijima koje su odgovorne za regulaciju protoka tekućine i hranjivih tvari između očne vodice i strome rožnice. Pojam »endotel« se u ovome slučaju ne upotrebljava pravilno jer endotel rožnice graniči s očnom vodicom za razliku od endotela krvnih žila koji graniči s krvlju ili limfom. Endotel rožnice ima drugačiju funkciju, porijeklo i izgled naspram endotela krvnih žila. U slučaju većeg oštećenja funkcije endotela rožnice, stroma se prekomjerno hidratizira (edem strome) i gubi se njezina transparentnost (4, 5).

### *Transkornealna apsorpcija*

Općenito su konstante brzine transkornealne apsorpcije lijekova relativno male (0,001–0,005  $\text{min}^{-1}$ ). S obzirom da se rožnica sastoj od hidrofilnog (stroma) i lipofilnih (epitel, endotel) slojeva, selektivna je barijera apsorpciji i lipofilnih i hidrofilnih

lijekova (slika 4.). Transkornealnu apsorpciju lijeka otežava vezanje ili zadržavanje lijeka u slojevima rožnice. Hidrofilnim je lijekovima epitel rožnice ograničavajući čimbenik apsorpcije, a stroma i endotel samo djelomično usporavaju njihovu permeaciju. U skladu s time stroma rožnice lipofilnim lijekovima pruža otpor pri apsorpciji. Za učinkovitu transkornealnu apsorpciju lijek bi trebao imati i lipofilne i hidrofilne karakteristike te dovoljno malu veličinu molekula (7–12).



**Slika 4.** Shematski prikaz transkornealne i transkonjunktivalne/transkieralne apsorpcije lijekova (9).

Optimalne vrijednosti transkornealne apsorpcije imaju umjereno lipofilni oftalmici ( $\log P = 2 - 3$ ), dok se lipofilniji oftalmici ( $\log P > 3$ ) ne apsorbiraju bolje kroz rožnicu. Naime, brza apsorpcija lipofilnih oftalmika ( $\log P > 3$ ) u lipofini epitel rožnice nakon čega slijedi mali koncentracijski gradijent kroz hidrofilnu stromu moguće je objasnjenje prethodnog opažanja. Molekulski oblik lijeka u pripravku utječe na transkornealnu apsorpciju. Optimiranjem pH pripravka moguće je povećati udjel neioniziranog oblika lijeka u pripravku što značajno utječe na poboljšanje transkornealne apsorpcije (4–6).

### Spojnica (*tunica conjunctiva*)

Nakon primjene na površinu oka lijek se intraokularno apsorpira transkornealnim (preko rožnice) i/ili nekornealnim (preko spojnice i bjeloočnice) putem (slika 4). Spojnica je važna za intraokularnu i/ili sistemsku apsorpciju lijeka. Spojnica je građena od epitela i strome (*substantia propria*). Epitel je višeslojan (5–15 slojeva stanica) i cilindričan te prekriven mikrovilima. Za razliku od epitela rožnice, epitel spojnice je

deblji i ima vrčaste stanice koje izlučuju sluz (*mucus*). Epitelne stanice apikalnog sloja povezane su čvrstim međustaničnim vezama (*tight junctions*). Stroma spojnice sadrži krvne i limfne žile, živce, žlijezde i njihove izvodne kanale, te stanice (brojne melanocite, fibroblaste, makrofage, mastocite, plazma-stanice i limfocite). Spojnica pridonosi stvaranju prekornealnog suznog filma izlučivanjem elektrolita, tekućine i sluzi (9). Epitel je spojnice ograničavajući čimbenik apsorpcije lijekova preko spojnice. Epitel spojnice ima 2 × veće pore paracelularnog puta i 16 × veću gustoću takvih pora u odnosu na epitel rožnice (13). Ukupna je površina paracelularnih pora spojnice približno 230 × veća u odnosu na takvu površinu na rožnici (9).

### Bjeloočnica (*sclera*)

Bjeloočnica je građena od gustih kolagenskih (~ 28,8 %) i pojedinih elastičnih (~ 1–2 %) vlakana, proteoglikana (~ 0,9 %), proteina, stanica (~ 3 %) i vode (68 %) (4). Glavni je mehanizam permeacije lijeka kroz bjeloočnicu pasivna difuzija kroz hidrofilne pore (kanale) unutar bjeloočnice, slično permeaciji tvari kroz strukturno sličnu stromu rožnice (slika 4). Obim zavojitosti pora (kanala) bjeloočnice značajno utječe na obim permeacije lijeka (13).

Bjeloočnica je relativno dobro permeabilna za makromolekulske lijekove (14). Permeabilnost je hidrofilnih polietilenglikola različite molekulske mase (PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000) kroz bjeloočnicu ½ × manja u odnosu na permeabilnost kroz spojnicu i 10 × veća u odnosu na permeabilnost kroz rožnicu (13).

Nakon permeacije kroz bjeloočnicu (transkleralna permeacija) daljnji put lijeka ovisi o dijelu oka. U prednjem dijelu oka lijek difundira preko zrakastog tijela do stražnje očne sobice (staklastog tijela). U stražnjem dijelu oka lijek permeira preko žilnice, pigmentnog epitela mrežnice i neuralne mrežnice do staklastog tijela (14).

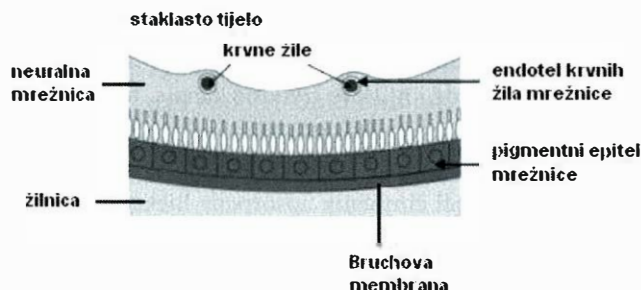
### Barijera krv-očna vodica

Raspodjela lijeka (male molekule) difuzijom iz sistemske cirkulacije u prednju očnu sobicu ograničena je barijerom krv-očna vodica koja je smještena u prednjem dijelu oka. Barijeru krv-očna vodica čini endotel krvnih žila šarenice i nepigmentni epitel zrakastog tijela. Stanični su slojevi obje barijere povezane čvrstim međustaničnim vezama (*tight junctions*) (15).

### Vanjska barijera krv-mrežnica

Pigmentni je epitel mrežnice monosloj visoko specijaliziranih kubičnih stanica smještenih između neuralne mrežnice i žilnice. Njegove su biokemijske funkcije ključne u procesu vida (fagocitoza vanjskih dijelova fotoreceptora, prijenos tvari između fotoreceptora i kapilara žilnice, konverzija retinoida). Čvrste veze među epitelnim stanicama učinkovito sprječavaju permeaciju tvari ovisno o veličini molekule i lipofilnosti. Pigmentni epitel mrežnice sprječava permeaciju lijeka iz žilnice u mrežnicu i čini vanjsku barijeru krv-mrežnica (slika 5) (15, 16).





**Slika 5.** Shematski prikaz barijere krv-mrežnica; vanjsku barijeru krv-mrežnica čini pigmentni epitel mrežnice, unutrašnju barijeru krv-mrežnica čini endotel krvnih žila mrežnice (15).

### Unutrašnja barijera krv-mrežnica

Unutrašnju barijeru krv-mrežnica čini endotel krvnih žila mrežnice (slika 5). Stanice endotela oblažu lumen kapilara mrežnice i povezane su čvrstim međustaničnim vezama (*tight junctions*) koje ograničavaju paracelularni prijenos. Unutrašnja je barijera krv-mrežnica vrlo slična krvno-moždanoj barijeri. Barijera je smještena u stražnjem dijelu oka i razdvaja tkivo mrežnice od krvi iz sistemske cirkulacije. Pri sistemske primjeni lijeka ograničava prolaz lijeka u ekstravaskularni prostor mrežnice i staklastog tijela. Primjerice, koncentracija je lijeka u staklastom tijelu svega 1–2 % njegove koncentracije u sistemske cirkulaciji nakon sistemske primjene. Unutrašnja barijera krv-mrežnica ograničava prijenos proteina i malih hidrofilnih molekula, dok lipofilne tvari relativno dobro permeiraju preko endotelnih stanica (15).

### Mrežnica

Barijeru čini slojevita građa neuralne mrežnice (intraretinalna barijera) koja je prepreka transretinalnoj difuziji makromolekula. Sloj glikozaminoglikana i proteina (interfotoreceptorski sloj) razdvaja neuralnu mrežnicu od pigmentnog epitela mrežnice. Taj sloj oblaže vanjske i unutrašnje dijelove fotoreceptora. Unutrašnje dijelove fotoreceptora i apikalne dijelove Müllerovih ganglijskih stanica poput remena okružuju i povezuju pričvrtni spojevi proteinske građe (*zonula adherens*, ZA, *adherens junctions*) – vanjska granična membrana. Značajan otpor difuziji tvari kroz neuralnu mrežnicu pružaju vanjska granična membrana te vanjski i unutrašnji mrežasti sloj (17).

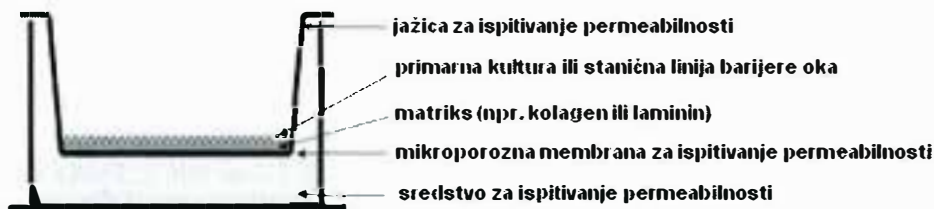
Poznavanje procesa difuzije tvari i/ili zadržavanja tvari unutar slojeva neuralne mrežnice važno je za rasvjetljavanje patofiziologije bolesti mrežnice i poboljšanje ciljane primjene lijeka u stražnji dio oka. Različite bolesti mrežnice (dijabetička retinopatija, hipertenzivna retinopatija) karakterizirane su povećanim otporom transretinalne difuzije tvari (npr. proteina) zbog čega se takve tvari drugačije raspodjeljuju i produljeno zadržavaju unutar slojeva neuralne mrežnice. Edem mrežnice nastaje zbog osmotskog učinka takvih tvari u slojevima neuralne mrežnice ili zbog povećanja

permeabilnosti krvnih žila mrežnice i/ili oštećenja vanjske barijere krv-mrežnica. Intraretinalna barijera utječe na farmakokinetiku nakon intravitrealne primjene lijeka (npr. difuziju lijeka do vanjske barijere krv-mrežnica i subretinalnog prostora, eliminaciju lijeka). Intravitrealna primjena lijeka ionoforemom ili osmotskim crpkama uključuje procese transretinalne difuzije tvari.

## ISPITIVANJA *IN VITRO*

Ispitivanja na staničnim modelima *in vitro* najčešće su metoda izbora u farmaceutskoj industriji za primarna probirna (*primary screening*) ispitivanja permeabilnosti i/ili citotoksičnosti/citokompatibilnosti lijeka. Stanični su *in vitro* modeli velikog kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka u jedinici vremena (*high throughput models*), dok istodobno ne omogućuju dobro predviđanje biorasploživosti lijeka u ljudi (*less predictive models*). Korištenjem *in vitro* modela obavlja se primarni probir tvari i/ili oblika poželjnih farmakokinetičkih svojstava te kvantitativno ispituju odnosi apsorpcije i metabolizma lijeka ovisno o njegovoj molekularnoj strukturi. Stanični modeli barijera oka pružaju uvid u građu i regulaciju pojedinih barijera te mehanizme prijenosa tvari (pasivni, aktivni prijenos lijekova ili endogenih tvari) preko barijera oka. Korištenjem takvih modela proučava se fiziologija, metabolizam i ekspresija proteina u pojedinim stanicama oka. Rezultati ispitivanja korisni su pri razvoju novih terapijskih sustava, posebno s uklopljenim lijekovima koji se temelje na nukleinskim kiselinama, (npr. kodirajućom DNA, protusmislenim nukleotidima, aptamerima, siRNA i microRNA) i ispitivanju njihove citotoksičnosti/citokompatibilnosti.

Stanični su modeli relativno dobro definirani sustavi s mogućnošću relativno lakog prilagođavanja uvjeta ispitivanja. Rezultati su ispitivanja korištenjem *in vitro* modela reproducibilniji u odnosu na ispitivanja na *ex vivo* i *in vivo* modelima (9, 15).



**Slika 6.** Shematski prikaz sustava za *in vitro* ispitivanje permeabilnosti na staničnim modelima bioloških barijera oka (15).

## Rožnica

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. Pri ispitivanjima se koriste različite kulture primarnih stanica i stanične linije epitelnih stanica

rožnice različitog podrijetla (kunić, štakor, hrčak, čovjek) [npr. HCE-kulture primarnih epitelnih stanica rožnice, HCEC-netransformirane stanice humanog epitela rožnice (18); SIRC-stanična linija epitela rožnice kunića (19, 20); HCE-T-stanična linija humanog epitela rožnice transformirana s pRSV-T (21); THCE-rekombinantnim SV40 adenovirusnim vektorom imortalizirana stanična linija humanog epitela rožnice (22)] (slika 6). Specifični uvjeti uzgoja staničnih linija s ciljem što većeg približavanja uvjetima *in vivo* detaljno su opisani drugdje (15). Postizanje primjerenih vrijednosti transepitelnog električnog otpora (TEER) pri uzgoju stanica važno je za ispitivanje permeabilnosti hidrofilnih tvari paracelularnim putem, dok su TEER vrijednosti manje važne pri ispitivanju permeacije lipofilnih tvari transcelularnim putem. Od svih modela za *in vitro* ispitivanja permeabilnosti lijekova, najbolje je opisana THCE stanična linija. Imortalizirane se THCE stanice kontinuirano dijele kroz više od 400 generacija, morfološki su slične normalnim epitelnim stanicama rožnice, stvaraju primjerenu *in vitro* barijeru (TEER 400–800  $\Omega$  cm<sup>2</sup>), u kulturi stvaraju 5–8 slojeva stanica s čvrstim međustaničnim vezama, dezmosomima, i mikrovilima. Polumjer je pora paracelularnog puta 0,7–1,6 nm, dok im je poroznost  $1,3\text{--}2,8 \times 10^{-7}$  (15, 22–24). Takav stanični model koristi se za ispitivanje pasivne permeacije tvari. Primjenom tog modela opažen je vrlo sličan prividni koeficijent permeabilnosti hidrofilnog modelnog lijeka atenolola *in vitro* ( $P_{\text{app}}$  atenolol =  $1,24 \times 10^{-6}$  cm/s) s prividnim koeficijentom permeabilnosti *ex vivo* na izoliranoj rožnici kunića ( $P_{\text{app}}$  atenolol =  $1,10 \times 10^{-6}$  cm/s) (15), dok su prividni koeficijenti permeabilnosti modelnih lipofilnih lijekova *in vitro* približno u pola manji.

Ekvivalenti rožnice *in vitro* izrađuju se tehnikom slojevitog uzgoja stanica pri čemu se po uzoru na rožnicu stvaraju slojevi epitela, strome i endotela. Tehnika slojevitog uzgoja stanica uključuje sljedeće korake: (i) uzgoj endotelih stanica rožnice na poroznim sintetskim membranama, (ii) prekrivanje endotelih stanica disperzijom kolagena koja sadrži stanice strome rožnice i (iii) uzgoj epitelnih stanica rožnice na sloju kolagena. Uzgoj epitelnih stanica na površini otopina/zrak osigurava stvaranje čvrstih međustaničnih veza (25). Tržišno dostupni trodimenzionalni modeli epitela rožnice proizvedeni su korištenjem imortaliziranih humanih epitelnih stanica rožnice (HCE, SkinEthic Laboratories) ili normalnih humanih keratinocita (EpiOcular, MatTek Corporation), a služe za ispitivanja okularne toksičnosti (HCE, EpoOcular) i/ili transkornealne permeabilnosti (HCE) *in vitro*.

### Spojnica

Nekornealnim se putem lijek apsorbira u oko preko bulbarne spojnice, a njezina permeabilnost ovisi o veličini i polarnosti molekule lijeka. Barijerna svojstva *in vitro* modela epitela spojnice služe za predviđanje intraokularne i sistemske apsorpcije lijeka. *In vitro* modeli epitelnih stanica spojnice koriste se za ispitivanja permeacije lijeka preko spojnice, vrednovanje različitih terapijskih sustava i za toksikološka ispitivanja. Kulture primarnih epitelnih stanica spojnice kunića najčešće se koriste za

ispitivanja permeabilnosti, dok su kulture primarnih epitelih stanica spojnice goveda korištene za toksikološka ispitivanja (15). U novije su vrijeme razvijene i karakterizirane i mortalizirane stanične linije humanog epitela spojnice; IOBA-NHC stanična linija (26, 27), HCjE stanična linija (28). Pri ispitivanju permeabilnosti i procjeni barijerne uloge modela važno je postići slična bioelektrična svojstva *in vitro* modela i svježe izolirane spojnice *ex vivo*. Tehnikom uzgoja stanica na površini otopina/zrak postižu se bolja barijerna svojstva *in vitro* modela. Primarne kulture epitelih stanica spojnice kunića (RCEC) uzgajane na površini otopina/zrak postižu TEER vrijednosti u području 1,1–1,9 k $\Omega$  cm<sup>2</sup>, a koja su slična TEER vrijednostima svježe izolirane spojnice kunića (1,3 k $\Omega$  cm<sup>2</sup>). Uzgoj relativno homogenih RCEC linija prednost je u usporedbi s biološki varijabilnim svježe izoliranim spojnica. Morfološka su svojstva RCEC modela slična svojstvima svježe izolirane spojnice (npr. mikrovili na apikalnoj površini, mali udjel vrčastih stanica koje proizvode sluz). Koeficijenti permeabilnosti lipofilnih  $\beta$ -blokatora ( $P_{app, in vitro}$  propranolol =  $0,98 \times 10^{-5}$  cm/s) korištenjem RCEC modela koreliraju s koeficijentima permeabilnosti ( $P_{app, ex vivo}$  propranolol =  $0,79 \times 10^{-5}$  cm/s) uporabom *ex vivo* modela. Istodobno, RCEC *in vitro* model 100  $\times$  je manje permeabilan za hidrofilne  $\beta$ -blokatore (npr. atenolol, sotalol) u usporedbi s *ex vivo* modelom moguće zbog učinka proteina nosača aktivnog prijenosa u svježe izoliranom tkivu. Također su opaženi slični koeficijenti permeabilnosti hidrofilnih neutralnih tvari pri *in vitro* ( $P_{app, in vitro}$  manitol =  $2,18 \times 10^{-7}$  cm/s) i *ex vivo* ( $P_{app, ex vivo}$  manitol =  $2,77 \times 10^{-7}$  cm/s) ispitivanjima. Moguće zbog većih pora paracelularnog puta *in vitro* modela (8 nm) u odnosu na pore svježe izolirane spojnice (5,5 nm) permeabilnost je makromolekulskih hidrofilnih tvari (FD20, FD70) 2  $\times$  veća pri *in vitro* ispitivanjima (15).

Pored mehanizama pasivne permeacije lijeka preko spojnice, u budućnosti je potrebno rasvijetliti ulogu aktivnog prijenosa (npr. P-glikoproteinskih nosača) pri intraokularnoj apsorpciji lijekova nekornealnim putem.

### Barijera krv-očna vodica

Naspram relativno dobro ispitanim staničnih modela barijere krv-mrežnica, stanični modeli barijere krv-očna vodica relativno su neispitani. Razvijane su kulture primarnih stanica nepigmentnog epitela zraka tog tijela, ali *in vitro* barijerna svojstva staničnog sloja (TEER 20–30  $\Omega$  cm<sup>2</sup>) neprikladna su za ispitivanja permeabilnosti. Stanični modeli kojima bi se ispitala barijerna svojstva endotela krvnih žila šarenice nisu razvijani (15).

### Vanjska barijera krv-mrežnica

Stanice pigmentnog epitela mrežnice (RPE) *in vitro* su modeli vanjske barijere krv-mrežnica. Kulture primarnih RPE stanica različitog podrijetla (žaba, štakor, pile, govedo, čovjek) koriste se za ispitivanja permeacije tvari i/ili nanosustava s

uklopljenim protusmislenim oligonukleotidima, ekspresije proteina te za ispitivanja citotoksičnosti. Proliferacija RPE stanica *in vitro* ovisi o brojnim čimbenicima (npr. podrijetlo, starost donatora, trajanje izolacije, uvjeti uzgoja) jer je proliferacija *in vivo* vezana isključivo za patološka stanja. Uvjeti uzgoja moguće mijenjaju morfološke i funkcionalne značajke stanica *in vitro*. Imortalizirane stanične linije pigmentnog epitela mrežnice različitog podrijetla (štakor, čovjek) razvijene su s ciljem poboljšanja modela pri ispitivanjima citotoksičnosti i metabolizma mrežnice (RPE-J stanice, D407 stanice), produljena životnog vijeka stanica (hTERT-RPE stanice), regulacije ekspresije gena, citotoksičnosti, permeabilnosti i prijenosnih mehanizama (ARPE-19 stanice) (15).

S obzirom na brojne specifičnosti RPE stanica, *in vitro* model primjerenih svojstava vanjske barijere krv-mrežnica još uvijek nije razvijen. Nedostaci su navedenih modela dugo vrijeme uzgoja (za određene stanične linije i do 2 mjeseca), gubitak specifičnih obilježja izvornog tkiva pri uzgoju, slaba barijerna svojstva s obzirom na relativno niske TEER vrijednosti ( $30\text{--}50 \Omega \text{ cm}^2$ ) u odnosu na TEER vrijednosti svježih izoliranih membrana pigmentnog epitela mrežnice ( $148\text{--}206 \Omega \text{ cm}^2$ ), ograničena dostupnost tkiva humanog podrijetla, relativno neispitani mehanizmi prijenosa tvari *in vivo* u smislu koreliranja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja (15).

### Unutrašnja barijera krv-mrežnica

Endotelne stanice krvnih žila mrežnice *in vitro* su modeli unutrašnje barijere krv-mrežnica. Kulture primarnih endotelnih stanica krvnih žila mrežnice goveda (BRCEC) koriste se za ispitivanja permeacije tvari preko unutrašnje barijere krv-mrežnica. Pokušaj poboljšanja barijernih svojstava modela u smislu povećanja TEER vrijednosti BRCEC stanica njihovim ko-kultiviranjem s Müllerovim stanicama relativno je neuspješan. Daljnje je poboljšanje tog modela razvoj imortalizirane linije endotelnih stanica krvnih žila mrežnice štakora (TR-iBRB). Uzgojem TR-iBRB stanične linije na membranama obloženim fibronektinom postignuta je morfološka sličnost sa stanicama primarne kulture. Ipak, TEER vrijednosti slične su stanicama primarne kulture ( $30 \Omega \text{ cm}^2$ ) te stoga barijerna svojstva TR-iBRB staničnom linijom nisu unaprijeđena (15).

### ISPITIVANJA EX VIVO

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



## Rožnica

Humana je rožnica jajolika oblika s horizontalnim promjerom od 11 do 12 mm i vertikalnim od 10 do 11 mm. Na rožnici se razlikuju vrh, rub te vanjska i unutarnja strana. Zone se prelaska rožnice u bjeloočnicu i bjeloočnice u spojnicu nazivaju *limbus*. Rožnica nije jednako debela u svim dijelovima. Humana je rožnica na rubu najdeblja (0,8–1,5 mm), a u području vrha najtanja (0,5–1 mm). Površina je humane rožnice 1,04 cm<sup>2</sup>. Rožnica je domaćih životinja tanja od 1 mm. U psa i goveda rožnica je centralno tanja u odnosu na limbalni dio, dok je u mačke i konja obrnuto (29). Rožnica je providna, glatka, sjajna i vlažna membrana. Obje su strane rožnice slobodne. Prednju stranu oblaže prekornealni suzni film, a stražnju stranu oplakuje očna vodica koja ispunja prednju očnu sobicu. U svom tkivu rožnica nema krvnih žila. Hranjive tvari i kisik prima iz rubne mreže krvnih žila. Preostali dio kisika prima iz atmosfere, pa ako je spriječena ta izmjena, aktivira se anaerobni metabolizam i tako povećava intrakornealna koncentracija mliječne kiseline. Tako se razvija edem rožnice i gubitak njezine providnosti (4, 30).

Tri glavna čimbenika određuju učinkovitost transkornealne permeacije: (i) struktura i integritet rožnice, (ii) fizičko-kemijska svojstva lijeka, (iii) ljekoviti oblik i pomoćne tvari pripravka (31).

S ciljem približavanja uvjetima *in vivo*, a pri razvoju *ex vivo* modela zbivanja u prekornealnom području i prednjoj očnoj sobici potrebno je u što većoj mjeri uzeti u obzir. Ispitivanja permeabilnosti *ex vivo* preko rožnice (transkornealna permeabilnost) provode se u protočnim difuzijskim ćelijama (npr. horizontalne difuzijske ćelije, Franzova difuzijska ćelija). Protočne su difuzijske ćelije sastavljene od donorskog i receptorskog odjeljka između kojih se smješta rožnica. Donorski odjeljak predstavlja prekornealno područje, dok receptorski odjeljak predstavlja prednju očnu sobicu. Za ispitivanja permeabilnosti najčešće se koristi svježe izolirana rožnica kunića (32).

Anatomski i fiziološki parametri prednjeg dijela humanog oka prikazani su tablicom 1. (33). U prekornealno područje obično se primjenjuje 25–50 µL pripravka koji se miješa i razrjeđuje sa suznom tekućinom volumena 7 µL. Normalni je volumen izmjene suzne tekućine 0,5–2,2 µL/min. pH suzne tekućine je 7,3–7,7. Prosječno 25 % suzne tekućine isparava s površine oka zbog čega je temperatura površine oka 34 °C, odnosno niža od normalne tjelesne temperature površine kože ili sluznica. Umjetna suzna tekućina (pH 7,4; ionska jakost 0,188) sastoji se od natrijeva klorida (0,670 g), natrijeva hidrogenkarbonata (0,200 g), kalcijeva klorid dihidrata (0,008 g) i pročišćene vode (do 100 g) (5, 34, 35).

Volumen očne vodice u prednjoj očnoj sobici je 261–310 µL. Normalni volumen izmjene očne vodice je 2–3 µL/min. Umjetna očna vodica sastavljena je od dva puferska sustava: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i NaHCO<sub>3</sub> – plinoviti CO<sub>2</sub> sljedećeg sadržaja elektrolita: Na<sup>+</sup> (148 mM), K<sup>+</sup> (4 mM), Ca<sup>2+</sup> (2 mM), Cl<sup>-</sup> (134 mM), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (20 mM), L-askorbinska kiselina (1,0 mM). pH umjetne očne vodice je 7,4 (36).

**Tablica 1.** Anatomski i fiziološki parametri prednjeg dijela humanog oka (33).

parametar	jedinica	vrijednost
volumen suzne tekućine ( $V_L$ )	[ $\mu\text{L}$ ]	7,0
brzina izlučivanja suzne tekućine ( $S$ )	[ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	1,2
konstanta brzine drenaže otopine s površine oka ( $K_d$ )	[ $\text{min}^{-1}$ ]	1,45
površina rožnice ( $A_c$ )	[ $\text{cm}^2$ ]	1,04
površina spojnice ( $A_j$ )	[ $\text{cm}^2$ ]	17,65
površina palpebralne spojnice ( $A_{pj}$ )	[ $\text{cm}^2$ ]	8,82
površina bulbarne spojnice ( $A_{bj}$ )	[ $\text{cm}^2$ ]	7,78
debljina rožnice ( $L$ )	[mm]	0,52
volumen očne vodice u prednjoj očnoj sobici ( $V_a$ )	[ $\mu\text{L}$ ]	261–310
brzina izlučivanja očne vodice izražena kao % $V_a$	[%/min]	1–2
volumen distribucije u prednjoj očnoj sobici ( $V_d$ )	[ $\mu\text{L}$ ]	150–3000
klirens u prednjoj očnoj sobici ( $C'_{la}$ )	[ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	1–30

Permeabilnost se ispituje najčešće 4–6 sati zbog ograničene vijabilnosti rožnice nakon izoliranja i relativno kratkog dodira pripravka s površinom oka u uvjetima *in vivo*. Svježe izolirana animalna rožnica smješta se između donorskog i receptorskog odjeljka tako da je epitelna površina rožnice usmjerena prema donorskom odjeljku. Uputno je započeti ispitivanje permeabilnosti približno ½ do 1 h nakon izolacije rožnice. Donorski i receptorski odjeljak pune se GBR puferom s dodatkom glutaciona (pH = 7,6). GBR pufer s dodatkom glutaciona pripravlja se miješanjem istih udjela pufera I (223 mM NaCl; 9,64 mM KCl; 1,57 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 2,08 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1,56 mM  $\text{MgCl}_2$ ) i pufera II (58,42 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 10,0 mM glukoza; 0,3 mM glutation). Pripravljene GBR pufer s dodatkom glutaciona uravnotežuje se smjesom  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95/5%) tijekom 15 min (37). Ispitivanje se provodi pri 34 °C uz miješanje sredstva u receptorskom odjeljku pomoću magnetskog mješača. U određenim vremenskim intervalima (npr. 40, 80, 120, 160, 200 i 240 min) iz receptorskog odjeljka uzimaju se uzorci određenog volumena, a uzeti volumen nadomješta se puferom, da bi se osigurao stalni volumen sredstva u receptorskom odjeljku. U uzorcima se analitičkim metodama određuje koncentracija lijeka i izračunava prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) ( $\text{cm s}^{-1}$ ) prema jednadžbi:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \times C_0 \times A \times 60} \quad //1/$$

gdje je  $\Delta Q/\Delta t$  ( $\mu\text{g min}^{-1}$ ) brzina permeabilnosti lijeka u receptorski odjeljak,  $C_0$  ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) početna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) površina rožnice raspoloživa za difuziju (npr. površina rožnice novozelandskog bijelog kunića težine 2,5–3,0 kg pri ispitivanju permeabilnosti korištenjem Franzove difuzijske ćelije je

0,70 cm<sup>2</sup>), 60 je faktor konverzije jedinica vremena iz minuta u sekunde (32). Rezultati ispitivanja transkornealne permeabilnosti lijeka predstavljaju raspoloživost lijeka u oku *ex vivo* ili apsorpcijski potencijal lijeka.

Gravimetrijskim određivanjem obima hidratacije rožnice rutinski se provjerava vijabilnost rožnice nakon ispitivanja permeabilnosti. Obim hidratacije rožnice (HR%) izračunava se prema jednadžbi:

$$HR\% = \left[ 1 - \left( \frac{W_t}{W_b} \right) \right] \times 100 \quad /2/$$

gdje je  $W_b$  (g) masa svježe izolirane rožnice,  $W_a$  (g) masa rožnice koja je nakon ispitivanja permeabilnosti sušena 6 h pri 100°C (32).

Svježe izolirana rožnica čuva se kratkoročno ili relativno dugoročno. Kratkoročno se rožnica čuva u GBR puferu s dodatkom glutaciona unutar nekoliko sati (npr. 6 h) nakon žrtvovanja životinje. Dugoročno se rožnica čuva u specijalnim otopinama za kulturu tkiva u inkubatoru pri 31°C do 30 dana ili u specijalnim otopinama u hipotermičkim uvjetima pri +2 do +8 °C u vremenskom razdoblju ovisnom o vrsti korištene otopine.

Nedostatak kratkoročnog čuvanja je ograničena vijabilnost rožnice na približno 6 sati od žrtvovanja životinje i izraženi utjecaj vremena ispitivanja na rezultate permeabilnosti. Oštećenje metaboličkih enzima i prijenosnih proteina u ovisnosti o vremenu ograničava ispitivanja transkornealne permeabilnosti samo na pasivnu difuziju lijeka niz koncentracijski gradijent. Metabolički enzimi i prijenosni proteini razlikuju se među vrstama što djelomično otežava predviđanje transkornealne permeabilnost u ljudi. Modeli *ex vivo* obično ne uzimaju u obzir dinamiku suzne tekućine i očne vodice te druge fiziološke mehanizme uklanjanja pripravka s površine oka (mehaničko uklanjanje treptanjem, potaknuto suženje, sistemska apsorpcija).

Ispitivanja permeabilnosti *ex vivo* s ciljem sekundarnog probira potencijalnih oftalmika osiguravaju određene prednosti. Iako su *ex vivo* probirna ispitivanja manjeg kapaciteta (*low-throughput models*) u odnosu na *in vitro* ispitivanja, primarnim se *in vitro* ispitivanjima bitno smanji broj oftalmika koje je potrebno uključiti u sekundarni probir. Istodobno, *ex vivo* modelom moguće je bolje predvidjeti bioraspoloživost oftalmika *in vivo* (*more predictive models*). Na taj se način bitno smanjuje broj oftalmika koje je potrebno ispitati *in vivo*. Primarnim i sekundarnim probirom smanjuje se broj životinja pri *in vivo* ispitivanjima, što je sukladno etičkim načelima obavljanja pokusa na životinjama. Probirnim se ispitivanjima ubrzava postupak i poboljšava ekonomičnost razvoja oftalmika. Posebna prednost tih ispitivanja je mogućnost prikupljanja svježih animalnih rožnica (govedo, svinja, kunići) iz obližnjih klaonica. Svježe rožnice su svakodnevno dostupne, prikupljanje je relativno jednostavno i ekonomično, a životinja se ne žrtvuje radi izoliranja rožnice, nego je ona otpad pri preradi.

## Spojnica

Spojnica je tanka sluznica prožeta krvnim žilama koja oblaže unutarnju stranu vjeđa (palpebralna spojnica) i prednji dio bjeloočnice do ruba rožnice (bulbarna spojnica). Oba dijela spojnice prelaze jedan u drugi u svodu (*forinx*) koji se nalazi na gornjoj i donjoj vjeđi. U ljudi je površina spojnice 17 × veća od površine rožnice, dok je u kunića površina spojnice 9 × veća od površine rožnice. Prednji je dio bjeloočnice spojen rijetkim vezivnim tkivom s očnom spojnicom. Zone se prelaska rožnice u bjeloočnicu i bjeloočnice u spojnicu nazivaju *limbus* (9, 29).

Brojna *in vivo* ispitivanja intraokularne apsorpcije lijekova na animalnom modelu (npr. kunića, štakora) najčešće ne pružaju uvid u prijenosne mehanizme apsorpcije lijeka u oko. U usporedbi s *ex vivo* ispitivanjima permeabilnosti lijekova preko rožnice, permeabilnost je lijekova preko spojnice manje ispitana (13, 38–40). Istodobno, ispitani su različiti mehanizmi prijenosa tvari (iona, glukoze, aminokiselina, nukleozida, peptida) preko epitela spojnice *in vitro* i *ex vivo*. Na apikalnoj površini epitelnih stanicama spojnice prisutni su različiti prijenosni proteini (PepT1, PepT2, P-glikoproteini, prijenosnici aminokiselina) koji mogu biti ključni pri prijenosu lijekova kroz spojnicu (9).

U provedenim je ispitivanjima pretežno korištena svježe izolirana spojnica kunića. Ispitivanja permeabilnosti *ex vivo* na spojnici slična su ispitivanjima permeabilnosti *ex vivo* na rožnici. Ispitivanja se provode u protočnim difuzijskim ćelijama (npr. Ussingov tip difuzijskih ćelija). S ciljem provjere vijabilnosti i barijernih svojstava određuju se bioelektrički parametri spojnice (razlika transepitelnog električnog potencijala i transepitelni električni otpor). Dizajn ispitivanja i obrada rezultata slična je prethodno opisanim ispitivanjima, a specifičnosti su ispitivanja opisane drugdje (13, 40, 41).

*Ex vivo* ispitivanja permeabilnosti hidrofilnih lijekova pokazuju da njihova intraokularna apsorpcija preko spojnice ovisi o njihovoj molekularnoj masi. Paracelularni je prijenos hidrofilnih tvari (hidrofilni lijekovi, ioni, voda) ograničen čvrstim vezama među stanicama epitela spojnice i pretežno ovisi o veličini hidrofilne molekule. Pravidni se koeficijenti permeabilnosti ( $P_{app}$ ) modelnih hidrofilnih lijekova smanjuju s povećanjem veličine molekule, odnosno s povećanjem molekulske mase: D-manitol (182 Da) > 6-karboksifluorescein (376 Da) > dekstrani obilježeni fluorescein izotiocijanatom FD4 (4400 Da) > FD10 (9400 Da) > FD20 (21300 Da) > FD40 (38600 Da). Dimenzije pora paracelularnog puta određuju pasivnu difuziju hidrofilnih molekula. Prosječni je polumjer pora paracelularnog puta epitela svježe izolirane spojnice je 5,5 nm, dok je njihova prosječna gustoća  $1,9 \times 10^8$  pora/cm<sup>2</sup>. Polumjer pora paracelularnog puta epitela palpebralne spojnice je 4,9 nm, dok bulbarne iznosi 3,0 nm. Molekulski je polumjer hidrofilnih lijekova molekulske mase < 550 Da manji od 2 nm, dok FD20 ima molekulski polumjer od 4,9 nm. Stoga kroz spojnicu relativno dobro permeiraju hidrofilne tvari molekulske mase < 20000 Da, dok kroz rožnicu ne mogu permeirati primjerice inulin (~ 5000 Da) ili FD20 (9).

Transepitelni je električni otpor (TEER) tkiva dobar pokazatelj njegovih barijernih svojstava. TEER svježe izolirane spojnice je  $\sim 1,3 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  i znatno je niži u usporedbi s TEER svježe izolirane rožnice ( $7\text{--}9 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ). Spojnica je manja prepreka permeabilnosti hidrofilnih tvari u usporedbi s rožnicom. Međutim, znatno je veća površina spojnice u odnosu na rožnicu presudan čimbenik bolje intraokularne apsorpcije hidrofilnih lijekova preko spojnice (9). Spojnica je približno  $15\text{--}25 \times$  permeabilnija za hidrofilne tvari u odnosu na rožnicu.

U ispitivanjima *in vivo* na animalnom modelu hidrofobni se lijekovi apsorbiraju većinom preko rožnice. Primjerice količina lijeka apsorbiranog preko rožnice prema količini lijeka apsorbiranog preko spojnice iznosi 70:1 za hidrokortizon, 12:1 za timolol i 5:1 za pilokarpin.

### Bjeloočnica

Bjeloočnica je sastavljena od 3 sloja: *episclera*, stroma (*sclera propria*) i *lamina fusca*. Episclera je izrazito vaskulariziran sloj građen od gustog kolagena koji uz *scleru* čvrsto veže Tenonovu kapsulu. Uz kolagen episcleria sadrži fibroblaste, proteoglikane i nešto melanocita. Kolagen koji gradi stromu bjeloočnice znatno je gušći od kolagena rožnice. Uz kolagen su u stromi prisutni i fibroblasti. *Lamina fusca* je prelazni sloj prema vanjskom dijelu srednje očne ovojnice. U bjeloočnici se nalaze brojni kanalići za prolaz krvnih žila i živaca. Duge cilijarne arterije i živci prolaze kroz bjeloočnicu do zrakastog tijela. U prednjem dijelu bjeloočnice smješten je intraskleralni venski splet putem kojeg očna vodica odlazi u koroidni venski pleksus (29, 42). Već iz same građe i hidrofilne prirode bjeloočnice ( $\sim 70\%$  vode) moguće je pretpostaviti relativno dobru transkleralu difuziju hidrofilnih tvari. Površina je humane bjeloočnice  $16,3\text{--}17,0 \text{ cm}^2$ . Prosječna je debljina bjeloočnice  $0,90 \text{ mm}$  u području optičkog živca,  $0,53 \text{ mm}$  u području korneoskleralnog limbusa,  $0,39 \text{ mm}$  u području ekvatora očne jabučice (43). Transkleralna permeabilnost lijeka značajno ovisi o debljini bjeloočnice i površini raspoloživoj za difuziju pa je u slučaju lokalne invazivne primjene pripravak uputno aplicirati u područje s najmanjom debljinom bjeloočnice. Nadalje, bjeloočnica osigurava značajno veću površinu raspoloživu za difuziju lijeka prema relativno maloj površini rožnice ( $\sim 1 \text{ cm}^2$ ) (42).

U ispitivanjima se pretežno koristi svježe izolirana bjeloočnica ljudi (43–45) i kunića (13, 46). Ispitivanja *ex vivo* na bjeloočnici slična su ispitivanjima *ex vivo* na rožnici i spojnici. Ispitivanja se provode u vertikalnim protočnim ćelijama (npr. Ussingov tip difuzijskih ćelija) ili horizontalnim protočnim ćelijama da bi se smanjio učinak transkleralnog tlaka na permeabilnost lijeka (42). S ciljem provjere vijabilnosti i barijernih svojstava određuju se bioelektrički parametri bjeloočnice (razlika transepitelnog električnog potencijala i transepitelni električni otpor). Dizajn ispitivanja i obrada rezultata vrlo je slična ispitivanjima na svježe izoliranoj rožnici i spojnici, a specifičnosti su ispitivanja opisane drugdje (13, 44). Na osnovu rezultata



ispitivanja izračunava se prividni koeficijent permeabilnosti ( $P_{app}$ ) ( $\text{cm s}^{-1}$ ) kao pokazatelj ravnotežnog fluksa lijeka niz koncentracijski gradijent prema jednadžbi:

$$P_{app} = \frac{(C_{ro} - C_{rt}) \times V}{C_o \times t \times S} \quad /3/$$

gdje je  $C_{ro}$  koncentracija lijeka u receptorskom odjeljku u vremenu 0,  $C_{rt}$  koncentracija lijeka u receptorskom odjeljku u vremenu  $t$ ,  $C_o$  početna koncentracija lijeka u donorskom odjeljku,  $V$  je volumen pojedinog odjeljka,  $t$  je vrijeme izraženo u sekundama,  $S$  je površina tkiva (44). Permeabilnost bjeloočnice za hidrofilne polietilenglikole različite molekulske mase (PEG 200, PEG 400, PEG 600, PEG 1000) $^{1/2} \times$  je manja u odnosu na permeabilnost spojnice i  $10 \times$  je veća u odnosu na permeabilnost rožnice (13).

### Pigmentni epitel mrežnice

Svježe izolirani pigmentni epitel mrežnice koristi se pri *ex vivo* ispitivanju pasivne difuzije (16, 47) i aktivnog prijenosa tvari te funkcije efluksnih crpki (48, 49). Ispitivanja se provode u vertikalnim protočnim ćelijama s donorskim i receptorskim odjeljkom između kojeg se smješta svježe izolirano tkivo. Tijekom ispitivanja u difuzijsko sredstvo donorskog i receptorskog odjeljka uvodi se smjesa plinova (5%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{O}_2$ , 85%  $\text{N}_2$ ). Uvođenje  $\text{CO}_2$  omogućuje održavanje pH pri 7,4–7,5 tijekom ispitivanja, dok niski udjel  $\text{O}_2$  uz glutation iz difuzijskog sredstva sprječava oštećenja tkiva i produljuje vijabilnosti pigmentnog epitela mrežnice. Difuzijsko sredstvo (BSS Plus<sup>®</sup>, Alcon) uz glutation sadrži glukozu, bikarbonate i elektrolite.

S ciljem praćenja vijabilnosti i barijernih svojstava određuju se bioelektrički parametri pigmentnog epitela mrežnice (razlika transepitelnog električnog potencijala i transepitelni električni otpor).

Prividni su koeficijenti permeabilnosti uporabom svježe izoliranog pigmentnog epitela mrežnice svinje za slabo permeabilne tvari (npr. hidrofilni atenolol) reda veličine  $10^{-7}$  cm/s, a za dobro permeabilne tvari (npr. memanit i nikotin) reda veličine  $10^{-5}$  cm/s. Prividni koeficijent permeabilnosti natrijevog fluoresceina ( $1,81 \times 10^{-7}$  cm/s) određen na takvom modelu sličan je prividnom koeficijentu permeabilnosti određenom pri ispitivanjima *in vivo* (15, 16).

Utjecaj je veličine molekule i lipofilnosti na permeabilnost preko svježe izoliranog pigmentnog epitela mrežnice ispitan korištenjem karboksifluoresceina (376 Da), dekstrana obilježenih fluorescein izotiocijanatom (FITC-dekstrani) (4–80 kDa) i  $\beta$ -blokatora različite lipofilnosti (atenolol, nadolol, pindolol, timolol, metoprolol, betaksolol). Permeabilnost se tvari smanjuje s povećanjem njihove molekulske mase; karboksifluorescein ima  $35 \times$  veću permeabilnost u usporedbi s FITC-dekstranom (80 kDa). Permeabilnost je lipofilnih  $\beta$ -blokatora  $8\text{--}20 \times$  veća u usporedbi s hidrofilnim atenololom i karboksifluoresceinom. Usporedbom s objavljenim permeabilnostima hidrofilnih i makromolekulskih tvari *ex vivo* preko bjeloočnice, permeabilnost

je pigmentnog epitela mrežnice 10–100 × manja. Permeabilnosti su lipofilnih tvari slične za bjeloočnicu i pigmentni epitel mrežnice. Pigmentni je epitel mrežnice jaka barijera apsorpciji hidrofilnih i makromolekulskih tvari, dok je lipofilnim tvarima jednaka barijera kao i bjeloočnica (16).

Pored opisanih fizičko-kemijskih čimbenika molekule lijeka (molekulska masa, lipofilnost, naboj) na permeabilnost preko pigmentnog epitela mrežnice značajno utječe afinitet vezanja lijeka za proteine aktivnog prijenosa. Takvi proteini mogu povećati ili smanjiti permeabilnost lijeka ovisno o tipu prijenosnika (inluksni ili efluksni) i/ili njihovom smještaju (vitrealna ili krvna strana). Vezanje lipofilnih lijekova za melanin pigmentnog epitela mrežnice također utječe na permeabilnost. Pigmentni epitel mrežnice i žilnica u ljudi sadržavaju prosječno 6–8 mg melanina. Lijek vezan za melanin ne može permeirati, a samo je kemijski potencijal nevezanog lijeka odgovoran za pasivnu difuziju lijeka niz koncentracijski gradijent (14).

### Neuralna mrežnica

Transretinalna difuzija ispitana je korištenjem svježe izolirane neuralne mrežnice goveda, svinje, kunića i ljudi. Permeabilnost se ispituje slično prethodno opisanim *ex vivo* ispitivanjima, a specifičnosti su ispitivanja opisane drugdje (17, 50).

Pasivni prijenos tvari preko neuralne mrežnice određen je veličinom molekule, stoga se često određuje granična molekulska masa pri transretinalnoj difuziji (50). Polumjer pora vanjske granične membrane neuralne mrežnice je 0,30–0,36 nm. Proteinske molekule hidrodinamičkog polumjera  $\leq 0,30$  nm permeiraju difuzijom preko barijere neuralne mrežnice, dok proteinske molekule hidrodinamičkog polumjera  $> 0,36$  nm ne difundiraju transretinalno (17). Nadalje, unutrašnji i vanjski mrežasti sloj neuralne mrežnice pruža značajan otpor transretinalnoj difuziji makromolekula. Granične molekulske mase transretinalne difuzije makromolekula preko ovih slojeva su 60 kDa u svinje, 78,5 kDa u goveda, 86 kDa u kunića i 76,5 kDa u ljudi. S obzirom na slične vrijednosti graničnih molekulskih masa, animalni modeli *ex vivo* prikladni su za ispitivanje transretinalne permeabilnosti (50).

### ISPITIVANJA IN VIVO

Biološka se ispitivanja farmakokinetike ili iritacije oka najčešće provode na kunićima (npr. novozelandski bijeli kunić), iako se ponekad koriste i druge životinjske vrste; primjerice psi (51, 52), mačke (53), majmuni (54). Etički i znanstveno opravdane pokuse na životinjama obavljaju pravne osobe registrirane u RH za obavljanje navedene djelatnosti u skladu s pozitivnim propisima RH (55). Kunići se najčešće drže u individualnim kavezima s dostupnom hranom i vodom *ad libitum*, u nastambi kontrolirane temperature (20–22 °C) i relativne vlažnosti (70–80 %) te zaštićenoj od akustičkih i optičkih nadražaja. Cirkadijani ritam izmjene dana i noći kontrolira se umjetnom svjetlošću (12 sati dan / 12 sati noć). Kunići se prilagođavaju uvjetima

nastambe određeno vrijeme (npr. 72 sata) prije početka pokusa. U pokusu se koristi najmanji potreban broj kunića za dobivanje statistički značajnih rezultata. Protokol pokusa mora biti izrađen s ciljem što manje patnje kunića pri ispitivanju.

Općenito se ispitivanje farmakokinetike u oku obavlja postupkom koji često zahtijevaju žrtvovanje jedne skupine kunića (npr. 4–6 kunića u skupini) za svaki vremenski interval uzimanja uzorka. Tako je za konstruiranje 10 točaka na krivulji ovisnosti koncentracije lijeka o vremenu pri ispitivanju samo jednog oblika potrebno žrtvovati 50 kunića (10 skupina sa po 5 kunića u skupini) (51–54).

Pri obradi i interpretaciji rezultata ispitivanja potrebno je voditi računa o različitim čimbenicima koji utječu na farmakokinetiku lijeka u oku: (*i*) volumen odjeljka u koji se lijek raspodjeljuje (najčešće u prednji dio oka – očna vodica, šarenica, zrakasto tijelo) (*ii*) vezanje lijeka za proteine očne vodice ili očnog tkiva (šarenica, zrakasto tijelo), (*iii*) izmjena (*turnover*) očne vodice, (*iv*) učinak lijeka na poticanje ili sprječavanje stvaranje i/ili izmjene očne vodice, (*v*) ravnotežno ponašanje lijeka između očne vodice i očnog tkiva i (*vi*) mogućnost metaboličke razgradnje lijeka u očnim tekućinama ili tkivima. Općenito, ako se pretpostavi da je koncentracija lijeka u suznoj tekućini maksimalna nakon primjene, tada je koncentracija u rožnici 1000 × manja, koncentracija u očnoj vodici 10 000 × manja, a koncentracija u staklastom tijelu 100 000 × manja od maksimalne koncentracije u suznoj tekućini (4–6).

Iz prednjeg se dijela oka u sistemsku cirkulaciju lijek/metabolit lijeka eliminira izmjenom očne vodice (očna se vodica prednje očne sobice ulijeva u venski sinus bjeloočnice i zatim u venski krvotok sistemske cirkulacije) i/ili venskim sustavom srednje očne ovojnice. Iz stražnjeg se dijela oka lijek/metabolit lijeka eliminira navedenim putovima eliminacije prednjeg dijela oka i/ili krvno-mrežničnim sustavom (4–6).

### *Ispitivanje farmakokinetike u oku analizom suzne tekućine*

U određenim bolestima potrebno je postići i održati terapijsku koncentraciju lijeka u prekornealnom području s ciljem njegovog površinskog učinka (npr. bakterijski konjunktivitis). Istodobno za površinski učinak lijeka važno je njegovo zadržavanje u prekornealnom području (*resident time*). U takvim slučajevima bitno je odrediti koncentraciju lijeka (npr. antibiotika) u suznoj tekućini. Ispitivani uzorak primjenjuje se na površina oka. U određenim vremenskim intervalima uzimaju se uzorci suzne tekućine pomoću staklenih mikrokapilara ili umetanjem filter papira (2 mm × 5 mm) u donju konjunktivalnu vrećicu određeno vrijeme (npr. 10 s). U uzorcima se analitičkim metodama određuje koncentracija lijeka i konstruira krivulja ovisnost koncentracije lijeka u suznoj tekućini o vremenu na osnovu koje se izračunavaju karakteristični farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija lijeka u suznoj tekućini ( $C_{max}$ ), vrijeme potrebno za postizanje  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), površina ispod krivulje (AUC) ovisnosti koncentracije lijeka u suznoj tekućini ( $C$ ) o vremenu ( $t$ ).

Opisano ispitivanje ne zahtijeva žrtvovanje kunića. Na svakoj se skupini kunića može ispitivati više različitih oblika nakon potpunog uklanjanja lijeka iz organizma (*washout period*), a što ovisi o lijeku/obliku i obično je nekoliko dana (56–60).

### Ispitivanje farmakokinetike u oku analizom očne vodice

Ispitivani uzorak primjenjuje se na površinu oka. Prije invazivnog postupka uzimanja uzorka očne vodice kunići se najčešće žrtvuju. Uzorak očne vodice uzima se uvođenjem igle u prednju očnu sobicu. Igla se najčešće uvodi kroz mjesto spajanja rožnice i spojnice. U uzorcima se analitičkim metodama određuju koncentracije lijeka. Na osnovu krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u očnoj vodici o vremenu izračunavaju se karakteristični farmakokinetički parametri: maksimalna koncentracija lijeka u očnoj vodici ( $C_{max}$ ), vrijeme potrebno za postizanje  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), površina ispod krivulje (AUC) ovisnosti koncentracije lijeka u očnoj vodici (C) o vremenu ( $t$ ) (1, 58, 61, 62).

### Ispitivanje farmakokinetike u oku analizom tkiva oka

Ispitivani uzorak primjenjuje se na površinu oka. U određenim vremenskim intervalima nakon primjene uzorka žrtvuju se određene skupine kunića i uzorkuju odabrana tkiva oka. Lijek se iz tkiva oka ekstrahira prikladnim otapalom nakon čega mu se određuje koncentracija različitim analitičkim metodama. Rezultati ispitivanja prikazuju se krivuljom ovisnosti koncentracije lijeka u tkivu (npr. rožnici, spojnici) prema vremenu na osnovu koje se određuju karakteristični farmakokinetički parametri (63).

### Ispitivanje farmakokinetike u oku određivanjem učinka lijeka

Ispitivani uzorak primjenjuje se na površinu oka. Različitim se metodama određuje farmakološki učinak lijeka u određenim vremenskim intervalima. Primjerice, određuju se: ( $i$ ) promjene promjera zjenice nakon primjene miotika (npr. pilokarpin) (64, 65) ili midrijatika (npr. tropikamid) (66), smanjenje intraokularnog tlaka (timolol, puerarin, epinefrin, acetazolamid, pilokarpin) (57, 67–69). Na temelju rezultata konstruira se krivulja ovisnosti farmakološkog učinka o vremenu i izračunaju se karakteristični farmakokinetički parametri. S obzirom da se tom metodom ne mjeri izravno koncentracija lijeka u tekućinama ili tkivima oka, nego se posredno preko farmakološkog učinka zaključuje o koncentraciji lijeka na mjestu njegovog učinka, ispitivanje je neizravna (posredna) mjera bioraspoloživosti lijeka. Određivanje promjera zjenice i mjerenje intraokularnog tlaka obavlja se rutinskim neinvazivnim postupcima za koje nije potrebno žrtvovati životinje.

### Ispitivanje farmakokinetike u oku određivanjem nuspojave lijeka

Ispitivanje je vrlo slično prethodnom ispitivanju, osim što se umjesto terapijskog učinka određuje nuspojava lijeka. Na osnovu određivanja nuspojave lijeka (npr.

povećanje intraokularnog tlaka učinkom kortikosteroida) neizravno se zaključuje o bioraspoloživosti lijeka. Na temelju rezultata ispitivanja određuju se karakteristični farmakokinetički parametri. Primjerice na temelju povećanja intraokularnog tlaka (IOT) kao nuspojave deksametazona određuju se sljedeći farmakokinetički parametri: (i) vrijeme potrebno za postizanje maksimalnog povećanja IOT ( $t_{\max}$ ); (ii) trajanje povećanja IOT ( $t_{\bullet T}$ ), tj. vremenski interval potreban za uspostavljanje bazičnih vrijednosti IOT prije ispitivanja; (iii) površina ispod krivulje (AUC) ovisnosti povećanja IOT (IOT%) o vremenu ( $t$ ), (iv) prividna konstanta eliminacije ( $k_{d,app}$ ) koja se izračunava iz nagiba pravaca  $\log [\Delta \text{IOT\%}] / \Delta t$  (70, 71).

### *Ispitivanje farmakokinetike u oku mjerenjem radioaktivnosti*

Ispitivanje uključuje mjerenje radioaktivnosti lijeka obilježenog radioaktivnim izotopom. Nakon primjene takvog lijeka na površinu oka mjerenjem je radioaktivnosti moguće odrediti različite farmakokinetičke parametre: konstante brzine apsorpcije ( $K_a$ ) lijeka u tkiva oka, obim apsorpcije lijeka u sistemsku cirkulaciju, raspodjelu lijeka intra- (npr. rožnica, leća, šarenica, zrakasto tijelo) i periokularno (npr. suzne žlijezde), maksimalne koncentracije lijeka ( $C_{\max}$ ) u tkivima oka (npr. spojnice, rožnica), vrijeme potrebno za postizanje  $C_{\max}$  ( $t_{\max}$ ) (51).

### *Ispitivanje iritacije oka*

Ispitivanje se iritacije obavlja na oku kunića pomoću skale Draize testa (72). U literaturi se često koriste različiti prilagođeni oblici ispitivanja u skladu s Draize testom (56, 63, 67, 70, 73, 74) (tablica 2.). Unilateralno se na površinu rožnice oka kunića primjenjuje ispitivani uzorak, a kontralateralno oko služi kao kontrola. Uzorak se primjenjuje jednokratno ili višekratno tijekom određenog vremena ovisno o tome ispituje li se akutna ili kronična iritacija oka. U određenim se vremenskim intervalima nakon primjene ispitivanog uzorka bilježe klinički znakovi iritacije i boduju u skladu sa skalom Draize testa (tablica 2.). Iritacija se oka svakog kunića izračuna zbrajanjem bodova opaženih za iritaciju rožnice, šarenice i spojnice. Zbrajanjem iritacijskih bodova opaženih za svakog kunića i dijeljenjem s ukupnim brojem kunića izračuna se ukupna iritacija ispitivanog uzorka. Stupnjevi iritacije su: ne iritira (0–3), blago iritira (4–8), umjereno iritira (9–12) i jako iritira (13–16).

Razlike oka kunića i ljudskog oka (morfološke, biokemijske, osjetljivost, obnavljanje epitela) te cijena mogući su nedostaci opisanog ispitivanja. Istodobno, kunići se lako pribavljaju, ispitivanja su relativno jednostavna i rezultati pokusa dobro predviđaju iritacije oka u ljudi.



**Tablica 2.** Skale bodovanja prema Draize za evaluaciju iritacije oka (72).

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

## ZAKLJUČAK

Neklinički modeli predviđanja bioraspoloživosti lijeka u oku uključuju *in vitro* i *ex vivo* ispitivanja permeabilnosti lijeka te *in vivo* ispitivanja farmakokinetike na animalnom modelu. Ispitivanja na animalnom modelu predmet su čestih kritika javnosti i znanstvene zajednice zbog etičkih i ekonomskih razloga. Stoga je potrebno razvijati *in vitro* i *ex vivo* modele za ispitivanje permeabilnosti s ciljem predviđanja bioraspoloživosti lijeka u oku. Stanični modeli barijera oka *in vitro* velikog su kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka u jedinici vremena, ali dosta ograničene predvidljivosti permeabilnosti lijeka. Takvi su modeli prikladni za primarna probirna ispitivanja permeabilnost lijeka. Tkivni modeli barijera oka *ex vivo* malog su kapaciteta s obzirom na broj ispitivanih uzoraka u jedinici vremena, ali relativno dobre predvidljivosti permeabilnosti lijeka. Modeli svježe izoliranih tkiva oka prikladni su za sekundarna probirna ispitivanja permeabilnosti lijeka.

## Models for the ocular drug permeability testing and bioavailability prediction

by I. Pepić, A. Hafner, J. Lovrić, J. Filipović-Grčić

### Abstract

Ocular barriers effectively protect the eye from pharmaceuticals. The development of strategies to overcome these barriers in order to improve ocular drug delivery remains a major challenge for pharmaceutical sciences. The aim of the present work is to describe the current models of the ocular barriers (corneal, conjunctival, scleral, blood-aqueous barrier, blood-retinal barrier).

*In vitro* cell culture models have been used to study passive drug permeation and active drug transport across different ocular barriers as well as for toxicological screening of compounds as alternative to *in vivo* toxicity tests. Primary cell cultures and immortalized cell lines as *in vitro* models of ocular barriers are reviewed herein. Primary cell cultures (e.g. corneal, conjunctival, retinal) of different origin (e.g. human, rabbit, rat, bovine, porcine) are described. Immortalized cell lines derived from corneal epithelial, conjunctival epithelial and retinal pigment epithelial cells have some advantages (the tissue isolation and cell purification is not required, growing after a large number of passages, revive after storage in liquid nitrogen) as well as disadvantages (potential abnormal characteristics, different gene expression profile) over primary cells. However, much work still needs to be done in order to develop cell-based permeability models of the ocular barriers for large scale screening of pharmaceutical compounds and formulations.

*Ex vivo* tissue models have been used to study drug permeation across freshly excised biological ocular barriers such as cornea, conjunctiva, sclera, retinal pigment

epithelium, neural retina. The results of drug permeability experiments with excised animal tissue are often less reproducible (species related applicability problems) in comparison to cell-based permeability experiments. Although the tissue based models represent low-throughput assay, this model provides a better prediction of *in vivo* ocular drug bioavailability in comparison to cell-based models.

*In vivo* animal experiments have been used for pharmacokinetic studies and ocular tolerance evaluations. The experiments are usually conducted on rabbits as commonly used animal model. In most cases rabbits have to be sacrificed at each time-point to collect samples in ocular pharmacokinetic studies. Therefore, animal experiments are often criticized for ethical and economical reasons. In this paper the different modifications of the classical pharmacokinetic studies are presented. The ocular pharmacokinetics can be studied by analyzing the drug concentrations into tear fluid, aqueous humor and different ocular tissues. Furthermore, the pharmacological or side effect can be determined as indirect measure of the ocular drug bioavailability. The commonly used Draize test for the ocular tolerance evaluation is briefly described.

## Literatura – References

1. Fialho SL, da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2004; 32:626–632.
2. Ding SL. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 1998; 1:328–335.
3. Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, Tabata Y. Drug delivery from ocular implants. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006; 3:261–273.
4. Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči. *Farm Glas.* 2004; 60:311–329.
5. Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2002; 28:353–369.
6. Pepić I. Novi sustavi za primjenu lijeka u oko. *Farm Glas.* 2004; 60:523–539.
7. Bourlais CL, Acar L, Zia H, Sado PA, Needham T, Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems-recent advances. *Prog Retin Eye Res.* 1998; 17:33–58.
8. Salamat-Miller N, Johnston IP. Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. *Int J Pharm.* 2005; 294:201–216.
9. Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60:227–240.
10. Dey S, Gunda S, Mitra AK. Pharmacokinetics of erythromycin in rabbit corneas after single-dose infusion: role of P-glycoprotein as a barrier to *in vivo* ocular drug absorption. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311:246–255.
11. Hariharan S, Gunda S, Mishra GP, Pal D, Mitra AK. Enhanced corneal absorption of erythromycin by modulating P-glycoprotein and MRP mediated efflux with corticosteroids. *Pharm Res.* 2009; 26:1270–1282.
12. Kaur IP, Garg A, Singla AK, Aggarwal D. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. *Int J Pharm.* 2004; 269:1–14.

13. Hamalainen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtili A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38:627–634.
14. Ranta VP, Urtili A. Transscleral drug delivery to the posterior eye: prospects of pharmacokinetic modeling. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58:1164–1181.
15. Hornof M, Toropainen E, Urtili A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 60:207–225.
16. Pitkanen L, Ranta VP, Moilanen H, Urtili A. Permeability of retinal pigment epithelium: effects of permeant molecular weight and lipophilicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:641–646.
17. Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, Garwin GG. Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26:1377–1380.
18. Wang Z, Sosne G, Kurpakus Whcatcr M. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) stimulates human corneal epithelial cell adhesion and migration in vitro. *Exp Eye Res.* 2005; 80:1–8.
19. Balakrishnan A, Jain-Vakkalagadda B, Yang C, Pal D, Mitra AK. Carrier mediated uptake of L-tyrosine and its competitive inhibition by model tyrosine linked compounds in a rabbit corneal cell line (SIRC)-strategy for the design of transporter/receptor targeted prodrugs. *Int J Pharm.* 2002; 247:115–125.
20. Lin MC, Jan CR. The anti-anginal drug fendiline elevates cytosolic Ca(2+) in rabbit corneal epithelial cells. *Life Sci.* 2002; 71:1071–1079.
21. Kruszewski FH, Walker TL, Di Pasquale LC. Evaluation of a human corneal epithelial cell line as an in vitro model for assessing ocular irritation. *Fundam Appl Toxicol.* 1997; 36:130–140.
22. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:614–621.
23. Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004; 78:125–136.
24. Yi X, Wang Y, Yu FS. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopoly-saccharide challenge. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:4093–4100.
25. Huhtala A, Salminen L, Tähti H, Uusitalo H. Corneal models for the toxicity testing of drugs and drug releasing materials: e-book, 2008.
26. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Saez V, Siemasko KE, Stern ME. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:4263–4274.
27. Diebold Y, Jarrin M, Saez V, Carvalho EL, Orea M, Calonge M, Seijo B, Alonso MJ. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials.* 2007; 28:1553–1564.
28. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Argueso P, Tisdale A, Ng TF, Russo CL. Mucin gene expression in immortalized human corneal-limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:2496–2506.
29. Pirkić B (2009), Bolesti roznice i bjeloočnice, <http://www.vef.unizg.hr/org/kirurgija/wp-content/uploads/2009/11/bolesti-roznice-i-bjeloočnice.pdf>, datum pristupa: 19. 10. 2011.

30. Ledić I, Rožnica u Oftalmologija. 3. ed. Zagreb: Jumena, 1990.
31. Ranade VV, Hollinger MA, Drug Delivery Systems. 2. ed. Boca Raton CRC Press, 2003.
32. Li X, Nie SF, Kong J, Li N, Ju CY, Pan WS. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm.* 2008; 363:177–182.
33. Zhang W, Prausnitz MR, Edwards A. Model of transient drug diffusion across cornea. *J Control Release.* 2004; 99:241–258.
34. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68:513–525.
35. Edsman K, Carlfors J, Petersson R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use. *Eur J Pharm Sci.* 1998; 6:105–112.
36. Richer SP, Rose RC. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision Res.* 1998; 38:2881–2888.
37. Ke TL, Graff G, Spellman JM, Yanni JM. Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: II. In vitro bioactivation and permeation of external ocular barriers. *Inflammation.* 2000; 24:371–384.
38. Wang W, Sasaki H, Chien DS, Lee VH. Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration. *Curr Eye Res.* 1991; 10:571–579.
39. Kompella UB, Kim KJ, Lee VH. Active chloride transport in the pigmented rabbit conjunctiva. *Curr Eye Res.* 1993; 12:1041–1048.
40. Horibe Y, Hosoya K, Kim KJ, Ogiso T, Lee VH. Polar solute transport across the pigmented rabbit conjunctiva: size dependence and the influence of 8-bromo cyclic adenosine monophosphate. *Pharm Res.* 1997; 14:1246–1251.
41. Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30:684–689.
42. Geroski DH, Edelhauser HF. Transscleral drug delivery for posterior segment disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 52:37–48.
43. Olsen TW, Edelhauser HF, Lim JI, Geroski DH. Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36:1893–1903.
44. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Enhanced FGF-2 movement through human sclera after exposure to latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42:2554–2559.
45. Cruysberg LP, Nuijts RM, Gilbert JA, Geroski DH, Hendrikse F, Edelhauser HF. In vitro sustained human transscleral drug delivery of fluorescein-labeled dexamethasone and methotrexate with fibrin sealant. *Curr Eye Res.* 2005; 30:653–660.
46. Ambati J, Canakis CS, Miller JW, Gragoudas ES, Edwards A, Weissgold DJ, Kim I, Delori FC, Adamis AP. Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41:1181–1185.
47. Hillenkamp J, Hussain AA, Jackson TL, Constable PA, Cunningham JR, Marshall J. Compartmental analysis of taurine transport to the outer retina in the bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:4099–4105.
48. Koyano S, Araie M, Eguchi S. Movement of fluorescein and its glucuronide across retinal pigment epithelium-choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:531–538.
49. Steuer H, Jaworski A, Elger B, Kaussmann M, Keldenich J, Schneider H, Stoll D, Schlosshauer B. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:1047–1053.



50. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:2141–2146.
51. Acheampong AA, Shackleton M, Tang-Liu DD, Ding S, Stern ME, Decker R. Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res.* 1999; 18:91–103.
52. Baeyens V, Felt-Baeyens O, Rougier S, Pheulpin S, Boisrame B, Gurny R. Clinical evaluation of bioadhesive ophthalmic drug inserts (BODI) for the treatment of external ocular infections in dogs. *J Control Release.* 2002; 85:163–168.
53. Bellhorn RW. Permeability of blood-ocular barriers of neonatal and adult cats to fluorescein-labeled dextrans of selected molecular sizes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981; 21:282–290.
54. Khoh-Reiter S, Jessen BA. Evaluation of the cytotoxic effects of ophthalmic solutions containing benzalkonium chloride on corneal epithelium using an organotypic 3-D model. *BMC Ophthalmol.* 2009; 9:5–12.
55. Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 135/2006
56. Lallemand F, Furrer P, Felt-Baeyens O, Gex-Fabry M, Dumont JM, Besseghir K, Gurny R. A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics. *Int J Pharm.* 2005; 295:7–14.
57. Qi H, Chen W, Huang C, Li L, Chen C, Li W, Wu C. Development of a poloxamer analogs/carbopol-based in situ gelling and mucoadhesive ophthalmic delivery system for puerarin. *Int J Pharm.* 2007; 337:178–187.
58. Di Colo G, Zambito Y, Burgalassi S, Nardini I, Saettone MF. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. *Int J Pharm.* 2004; 273:37–44.
59. Hiratani H, Fujiwara A, Tamiya Y, Mizutani Y, Alvarez-Lorenzo C. Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses. *Biomaterials.* 2005; 26:1293–1298.
60. Ma WD, Xu H, Wang C, Nie SF, Pan WS. Pluronic F127-g-poly(acrylic acid) copolymers as in situ gelling vehicle for ophthalmic drug delivery system. *Int J Pharm.* 2008; 350:247–256.
61. 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.
62. Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials.* 2002; 23:3247–3255.
63. Gan L, Gan Y, Zhu C, Zhang X, Zhu J. Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: in vitro and in vivo results. *Int J Pharm.* 2009; 365:143–149.
64. Pepić I, Jalšenjak N, Jalšenjak I. Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine. *Int J Pharm.* 2004; 272:57–64.
65. Chan J, Maghraby GM, Craig JP, Alany RG. Phase transition water-in-oil microemulsions as ocular drug delivery systems: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2007; 328:65–71.
66. Cappello B, Carmignani C, Iervolino M, Immacolata La Rotonda M, Fabrizio Saettone M. Solubilization of tropicamide by hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and water-soluble polymers: in vitro/in vivo studies. *Int J Pharm.* 2001; 213:75–81.

67. Guinedi AS, Mortada ND, Mansour S, Hathout RM. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2005; 306:71–82.
68. Hsiue GH, Guu JA, Cheng CC. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) film as a drug delivery system for pilocarpine. *Biomaterials.* 2001; 22:1763–1769.
69. Kaur IP, Singh M, Kanwar M. Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide. *Int J Pharm.* 2000; 199:119–127.
70. Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Pirkić B, Filipović-Grčić J. A nonionic surfactant/chitosan micelle system in an innovative eye drop formulation. *J Pharm Sci.* 2010; 99:4317–4325.
71. Kassem MA, Abdel Rahman AA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm.* 2007; 340:126–133.
72. Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45:493–515.
73. Bozdag S, Gumus K, Gumus O, Unlu N. Formulation and in vitro evaluation of cysteamine hydrochloride viscous solutions for the treatment of corneal cystinosis. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 70:260–269.
74. Agnihotri SM, Vavia PR. Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. *Nanomedicine.* 2009; 5:90–95.

*Primljeno 5. prosinca 2011.*