

Nanočestice kao terapijski sustavi za primjenu lijeka u oko

IVAN PEPIĆ, NIKA KAIĆ I JELENA FILIPOVIĆ-GRČIĆ

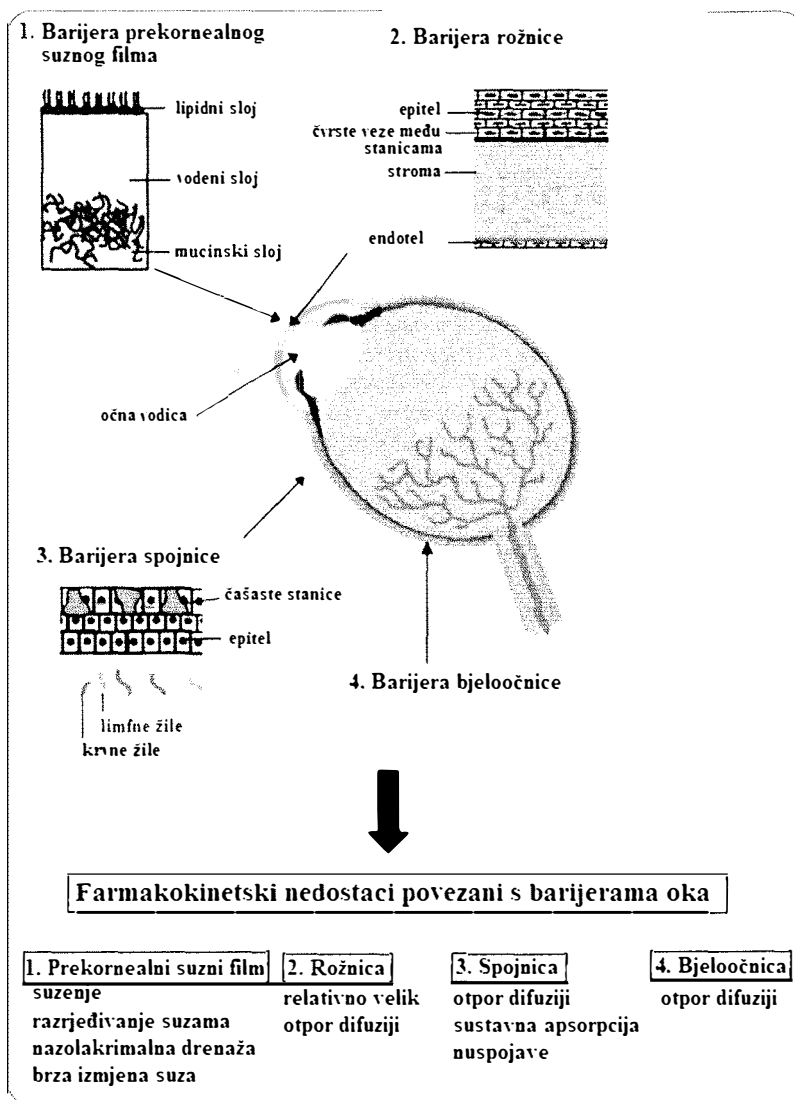
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Glavni je cilj oftalmičke primjene osigurati terapijsku koncentraciju lijeka na ciljanom mjestu djelovanja (tj. na površini ili unutarnjim segmentima oka) kroz određeno vrijeme. U tu svrhu ispitivani su sljedeći farmaceutsko-tehnološki pristupi: (i) terapijski sustavi za liječenje površinskih oboljenja oka ili terapijskih sustavi za primjenu lijeka preko ekstraokularnih tkiva do unutarnjih segmenata oka; i (ii) terapijskih sustavi kontroliranog oslobađanja lijeka koji se injiciraju izravno u bjeloočnicu (subkonjunktivalna injekcija) ili druge unutarnje segmenate oka (npr. intravitrealna injekcija). Među ostalim sustavima ispitivanim u takve svrhe, terapijski sustavi nanometarskih veličina iznimno su privlačni zbog jednostavnosti primjene i prihvatljivosti bolesnika, jer mogu biti primijenjeni u tekućem ljekovitom obliku relativno niske viskoznosti. Cilj je ovoga rada opisati prednosti i realne mogućnost lokalne oftalmičke primjene nanočestica građenih od različitih biopolimera. Povećavanje složenosti takvih nanosustava kroz vrijeme rezultiralo je njihovom uvjetnom podjelom na nosače nanometarskih dimenzija prve, druge i treće generacije. Nadalje, zadnja poglavlja ovoga rada posvećena su intraokularnoj primjeni nanočestica putem subkonjunktivalnih ili intravitrealnih injekcija. U cjelini, ovaj rad pokazuje brojne mogućnosti nanočestičnih terapijskih sustava u smislu poboljšanja terapijskog učinka oftalmičkih lijekova. Također ističe da bolje razumijevanje međudjelovanja takvih nanosustava s tkivima oka omogućuje farmaceutsko-tehnološku izradu sofisticiranih nanočestica specifično za oftalmičku primjenu.

BIOFARMACEUTSKE PREPREKE PRI OFTALMIČKOJ PRIMJENI

Različiti načini primjene lijeka u oko (npr. površinska, subkonjunktivalna, intravitrealna) isključivo su namijenjeni lokalnoj dostavi lijeka s ciljem liječenja bolesti različitih segmenata oka, a ne kao način sistemske primjene lijeka. Lokalna oftalmička primjena najjednostavnija je i najbolje prihvaćena od bolesnika. Tekući ljekoviti oblici otopina i suspenzija najčešće se lokalno primjenjuju u oko zbog jednostavnosti doziranja, a bez ometanja vida. Međutim, takvi oblici često su prilično neučinkoviti zbog različitih barijera oka koje su posljedica njegove anatomske građe i zaštitnih fizioloških mehanizama (slika 1.). Većina se ljekovitog oblika lokalno primijenjenog na površinu oka razrjeđuje u prekornealnom suznom filmu. Prekomjerni se volumen primijenjenog pripravka izliva preko ruba vjeđe, dok se volumen pripravka razrijeđen suznom tekućinom ubrzo drenira



Slika 1. Barijere oka: 1. Barijera prekornealnog suznog filma, 2. Barijera rožnice, 3. Barijera spojnice, 4. Barijera bjeloočnice (2).

u nazolakrimalni kanal. Zbog toga se veći dio primijenjenog volumena pripravka ispire s površine oka u vremenu od 2–4 minute. Uslijed nazolakrimalne drenaže, većina primijenjene doze lijeka nije raspoloživa za terapijski učinak, već se apsorbira u sistemsku cirkulaciju putem okolnih ekstraorbitalnih tkiva (uglavnom spojnice) i sluznice nosa, što je tzv. neproduktivna apsorpcija lijeka. U slučaju da je mjesto ciljanog učinka lijeka unutarnji segment oka, rožnica je glavni put apsorpcije lijeka. Apsorptivna površina rožnice je relativno mala u usporedbi s apsorptivnom površinom spojnice ili sluznice nosa, te je ograničena

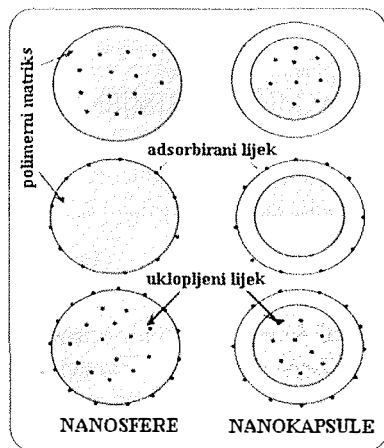
na prosječno 2 cm². Nadalje, apsorpcija putem rožnice ograničena je i trima barijerama: epitel, stroma i endotel rožnice. Stanice endotela i posebno epitela rožnice povezane su čvrstim međustaničnim vezama koje ograničavaju apsorpciju hidrofilnih tvari. Stroma rožnice, zbog relativno visokog udjela vode, ograničava apsorpciju lipofilnih tvari. Zbog anatomske građe rožnice i fizioloških zaštitnih mehanizama oka, samo se 1–5% primijenjene doze lijeka apsorbira intraokularno u očnu vodicu. Loša bioraspoloživost lijeka u oku rezultira učestalim doziranjem ljekovitog pripravka, čime se povećava sistemska apsorpcija i nuspojave lijeka te nepovoljno utječe na suradljivost bolesnika (1).

U određenim bolestima oka intraokularni je način primjene nužan da bi se postigla terapijska koncentracija lijeka u intraokularnim tkivima (1).

Opisana biofarmaceutska ograničenja nedvojbeno ukazuju na potrebu razvoja terapijskih sustava za oftalmičku primjenu lijeka. Specifični zahtjevi oftalmičke primjene, kao što su očuvanje vidnog aparata i oštine vida te svojstvena osjetljivost oka, značajno ograničavaju mogućnosti pripreme optimalnih terapijskih oftalmičkih pripravaka.

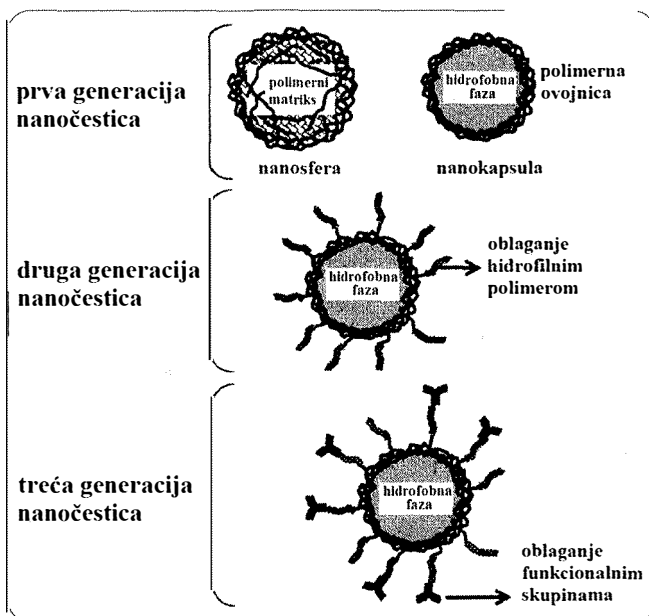
Klasifikacija nanočestica za primjenu lijeka u oftalmologiji

Opisane su dvije vrste nanočestica: (i) nanočestice matriksnog tipa (nanosfere) kod kojih je lijek uklopljen ili jednostavno adsorbiran na njihovu površinu i (ii) nanočestice spremišnog tipa (nanokapsule) koje su građene od polimerne ovojnice koja okružuje jezgru u tekućem agregatnom stanju s lijekom (slika 2.). U ovome se radu nanočestice matriksnog tipa nazivaju nanosfere, dok se nanočestice spremišnog tipa nazivaju nanokapsule.



Slika 2. Različiti tipovi nanočestica s uklopljenim lijekom (3).

Polimerne nanočestice za primjenu u oftalmologiji svrstane su u tri kategorije: (i) prva generacija elementarnih nanosfera i nano kapsula, (ii) druga generacija nanosfera i nanokapsula obloženih hidrofilnim polimerom i (iii) treća generacija funkcionalnih nanosfera i nanokapsula (slika 3.) (4).



Slika 3. Shematski prikaz nanočestica za primjenu lijeka u oko: (i) prva generacija elementarnih nanosfera (biološki aktivna tvar uklopljena ili jednostavno adsorbirana na površinu) i nanokapsula (biološki aktivna tvar otopljena u tekućoj jezgri i okružena polimernom ovojnicom); (ii) druga generacija nanosfera i nanokapsula obloženih hidrofobnim polimerom; i (iii) treća generacija nanosfera i nanokapsula promijenjenih svojstava površine, što je postignuto uvođenjem različitih funkcionalnih skupina (npr. antitijela) (4).

NANOČESTICE ZA OFTALMIČKU PRIMJENU

Zaštitni fiziološki mehanizmi oka značajni su čimbenici pri razmatranju učinkovitosti primjene tekućih ljekovitih oblika u terapiji oboljenja oka. Nanočestice pružaju brojne mogućnosti povećanja koncentracije lijeka u prednjem segmentu oka s istodobno manjom učestalošću doziranja.

Prva generacija nanočestica

Nanočestice su prvi put predložene za oftalmičku primjenu 1981., iako su primarno namijenjene za *i.v.* primjenu. Gurny i suradnici (5) prvi su ukazali na prednosti nanosfera nazvanih pseudolateksi u usporedbi s vodenim otopinama polimera.

Nanosfere (0,3 μm) građene od celulozaacetatftalata (CAP) s adsorbiranim pilokarpinom održavaju konstantnu miozu oka kunića u periodu od 10 sati, dok klasične kapi za oči s pilokarpinom održavaju miozu oka kunića u vremenu od 4 sata (5). Nakon takvih početnih spoznaja, uslijedila su brojna ispitivanja oftalmičke primjene različitih polimera za izradu nanočestica, uključujući: akrilne polimere i posebice poli(alkilcijanoakrilate) (PACA), poliestere, tj. poli- ϵ -kapolakton i polisaharide, kao što su hijaluronska kiselina i kitozan. Pregled ispitivanja oftalmičke primjene nanočestica građenih od navedenih polimera prikazan je tablicom 1.

Nanočestice građene od akrilnih polimera

Prva ispitivanja nanočestica građenih od akrilnih polimera u oftalmičkoj primjeni vezana su za nanosfere građene od poli(alkilcijanoakrilata) (PACA). Opaženo je da se PACA nanosfere produljeno zadržavaju u prekornealnom području i kao takve mogu poslužiti kao nanorezervoari s produljenim oslobađanjem lijeka. Zbog zadržavanja sustava na površini oka, povećana je koncentracija u rožnici te su pojačani i/ili produljeni njihovi farmakološki učinci (npr. pilokarpin, betaksolol, karteolol, aminoglikozid amikacin i imunosupresivni peptid ciklosporin A). Zadržavanje nanočestica na površini oka značajno se povećava pri upalnim stanjima površinskih tkiva oka, zbog povećane permeabilnosti epitela edemom zahvaćenog tkiva spojnice (4). Unatoč poboljšanju bioraspoloživosti lijekova PACA nanosfere štetne su za oko, jer uzrokuju razaranje staničnih membrana epitela rožnice (6). Takav negativan učinak PACA nanosfera nije u potpunosti razjašnjen.

Okularna toksičnost PACA polimera nije zaustavila istraživanja drugih tipova akrilnih polimera, npr. kopolimera etilakrilata, metilmetakrilata i klorotrimetil-amonijetilmetakrilata (Eudragit®) (7) i poliakrilamida (8). Nanosfere građene od Eudragita® s uklopljenim ibuprofenom i flurbiprofenom poboljšavaju njihovu bioraspoloživost i farmakološki učinak. Nanosfere građene od poliakrilamida s uklopljenim epinefrinom produljuju smanjenje intraokularnog tlaka (IOT) (4, 7, 8). Daljnja ispitivanja okularne podnošljivosti i toksičnosti nužna su da bi se procijenila mogućnost praktične primjene takvih nanosfera u terapiji.

Tablica 1. Primjeri nanočestica prve generacije za lokalnu oftalmičku primjenu (4).

polimer	lijek (sustav)	rezultati ispitivanja <i>in vivo</i>
^a CAP	pilokarpin (nanosfere)	produljena mioza
^b Eudragit®	ibuprofen, flurbiprofen (nanosfere)	poboljšana bioraspoloživost lijeka u oku: povećana koncentracija u očnoj vodici, sprječavanje mioze uzrokovane kirurškom traumom
	klorikromen (nanosfere)	poboljšana bioraspoloživost lijeka u oku: povećana koncentracija u očnoj vodici
^c PIPAA	epinefrin (nanosfere)	produljeno smanjenje intraokularnog tlaka (IOT ^d)
^d PACA	³ H-progesteron (nanosfere)	smanjena koncentracija lijeka u rožnici, spojnici i očnoj vodici
	pilokarpin (nanosfere)	produljena mioza produljena mioza i poboljšano smanjenje IOT
		poboljšana bioraspoloživost lijeka u oku: povećana koncentracija lijeka u očnoj vodici
	bataksolol (nanosfere) amikacin (nanosfere)	produljeno smanjenje IOT poboljšana bioraspoloživost lijeka u oku: povećana koncentracija lijeka u rožnici i očnoj vodici

polimer	lijek (sustav)	rezultati ispitivanja <i>in vivo</i>
	³ H-ciklosporin (nanokapsule)	produljeno održavanje terapijske koncentracije lijeka u rožnici, bjeloočnici, srednjoj očnoj ovojnici i mrežnici u usporedbi s uljnom otopinom ciklosporina
°PECL	metipranolol (nanokapsule)	smanjenje sistemskih kardiovaskularnih nuspojava i poboljšano smanjenje IOT
	betaksolol (nanokapsule, nanosfere)	značajno smanjenje IOT u usporedbi s ^d PACA ili ^f PLGA s uklopljenim betaksololom smanjenje IOT izraženije za PECL nanokapsule prema PECL nanosferama
	karateolol (nanokapsule, nanosfere)	poboljšano smanjenje IOT koje je značajnije za nanokapsule prema nanosferama smanjenje sistemskih kardiovaskularnih nuspojava izraženije za nanokapsule prema nanosferama
	ciklosporin A (nanokapsule)	produljen učinak ciklosporina A u usporedbi s uljnom otopinom ciklosporina A
	indometacin (nanokapsule, nanosfere)	poboljšana bioraspoloživost: povećana koncentracija lijeka u rožnici, očnoj vodici, šarenici-zrakastom tijelu prema indometacinu uklopljenom u mikročestice (6 μm) i prema otopini lijeka
kitozan	ciklosporin A (nanosfere)	veće koncentracije i produljeni učinak ciklosporina A u rožnici i spojnici; zanemariva koncentracija lijeka intraokularno i u sistemskoj cirkulaciji u usporedbi prema suspenziji ciklosporina A u otopini kitozana

°CAP: celulozaacetatftalat; ^bEudragit[®]: kopolimeri etilakrilata, metil-metakrilata i klorotrimetil-amonijetil-metakrilata; ^cPIPAA: poli(izopropilakrilamid); ^dPACA: poli(alkilcijanoakrilat); ^ePECL: poli-epsilon-kaprolakton; ^fPLGA: kopolimer poli(mliječne kiseline) i poli(glikolne kiseline); ^gIOT: intraokularni tlak.

Nanočestice građene od poliestera

Uporabi poli-ε-kaprolaktona (PECL) i kopolimera mliječne i glikolne kiseline (PLGA) u pripravi nanočestica za oko pridonijela je njihova pouzdana primjena kao kirurškog konca i implantanata. Nanočestice građene od PECL i PLGA polimera vrlo su dobro podnošljive u oku te kao takve primjerene za izradu oftalmičkih terapijskih sustava (9).

Prvi dokazi o prikladnosti poliestera za izradu oftalmičkih terapijskih sustava objavljene su 1992. Nanočestice građene od PACA, PECL i PLGA s uklopljenim betaksololom uspoređivane su s komercijalnim kapima za oči s betaksololom. Betaksolol uklopljen u nanočestice učinkovitije smanjuje IOT u usporedbi s učinkom komercijalnih kapi za oči. Optimalan farmakološki učinak betaksolola opažen je za betaksolol uklopljen u PECL nanokapsule zbog nakupljanja hidrofobnih nanočestica u spojničnoj vrećici te postupnim oslobađanjem betaksolola iz nakupina nanočestica u prekornealno područje (4).

Metipranolol uklopljen u PECL nanokapsule poboljšano se apsorbira u oko kroz rožnicu, odnosno smanjeno u sistemsku cirkulaciju preko spojnice, a zbog boljeg međudjelovanja PECL nanokapsula s površinom rožnice u odnosu na površinu spojnice. Zbog toga ima značajno bolji farmakološki učinak u oku i manje izražene kardiovaskularne nuspojave povezane sa sistemskom apsorpcijom (4).

Pri usporedbi PECL nanosfera (≈ 200 nm) i PECL mikrosfera (≈ 6 μ m) s uklopljenim indometacinom, nanosfere značajno poboljšavaju oftalmičku bioraspoloživost uklopljenog lijeka zbog njihovog boljeg međudjelovanja s epitelnim stanicama rožnice (4).

Suprotno prethodnim rezultatima, PECL nanokapsule s uklopljenim ciklosporinom A ne poboljšavaju bioraspoloživost lijeka zbog jakog vezanja lijeka s hidrofobnim dijelovima PECL polimera (4).

Nanočestice građene od polisaharida

Prethodno opisani poliesteri hidrofobni su polimeri koji se u organizmu razgrađuju na hidrofilne oligomere te takvi izlučuju. Nasuprot njima, posljednjih godina pažnju privlače hidrofilni polisaharidi, prvenstveno hijaluronska kiselina i kitozan.

Hijaluronska kiselina biorazgradiva je i sigurna za primjenu u oftalmologiji. Rabi se kao zamjena za staklastu tekućinu pri intraokularnim operacijama, jer je osnovna sastavnica staklastog tijela. Kitozan je polikationski biopolimer sa svojstvima primjerenim uporabi u oftalmologiji; posebno mukoadhezivnost, biorazgradivost u sluznici bogatoj lizozimima (npr. sluznica oka) te poticanje cijeljenja rana i antimikrobni učinak (4).

Brojna ispitivanja dokazuju produljeno zadržavanje lijeka na površini oka uporabom otopina hijaluronske kiseline. Mikrosfere građene od hijaluronske kiseline produljeno zadržavaju uklopljeni metilprednizolon na površini oka kunića. Uzimajući u obzir utjecaj veličine na međudjelovanje čestica sa sluznicom oka, izrađene su nanosfere građene od hijaluronske kiseline i kitozana koje su stabilne u umjetnoj suznoj tekućini te se očekuju ispitivanja mehanizma međudjelovanja nanočestica sa sluznicom oka (4).

Kitozanske nanosfere s uklopljenim ciklosporinom A značajno povećavaju koncentraciju ciklosporina A u vanjskim tkivima oka (rožnica i spojnica), dok je koncentracija ciklosporina A u unutarnjim dijelovima oka (npr. očna vodica, šarenica i zrakasto tijelo) i sustavnoj cirkulaciji zanemariva. Rezultati upućuju na moguću primjenu kitozanskih nanosfera u liječenju površinskih oboljenja oka, kao što su npr. sindrom suhog oka i različita upalna stanja (4).

Relativno visoke koncentracije ciklosporina A u vanjskim tkivima oka objašnjene su produljenim zadržavanjem kitozanskih nanočestica s uklopljenim lijekom na površini rožnice i spojnice (4). Istodobno, ispitivanja okularne podnošljivosti kitozanskih nanočestica pokazuju odličnu podnošljivost bez znakova iritacije i/ili oštećenja površinskih dijelova oka (10).

Druga generacija nanočestica

Nanočestice prve generacije produljuju dodir s površinom oka, što može rezultirati poboljšanom penetracijom lijeka u oko. Međudjelovanja nanočestica prve generacije s

površinom oka posljedica su njihove građe i veličine. S ciljem daljnjeg poboljšanja međudjelovanja nanosustava s površinom oka izrađene su nanočestice obložene polimerom ovojnicom. U tom smislu, važno je naglasiti da je poboljšanje međudjelovanja nanočestica s rožnicom prvi izbor za lijekove s ciljnim mjestom učinka u unutarnjem segmentu oka. Nasuprot tome, poboljšano međudjelovanje nanočestica sa spojnicom i kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka pružaju mogućnost liječenja oboljenja vanjskog segmenta oka. Tablicom 2. prikazana su svojstva nanočestica druge generacije.

Oblaganje poliakrilnim polimerima

Najjednostavniji pristup izradi obloženih sustava je dispergiranje nanočestica u vodenoj otopini mukoadhezivnog polimera. Pri istodobnoj primjeni albuminskih nanočestica s uklopljenim pilokarpinom i mukoadhezivnih polimera poliakrilne kiseline (Carbopol®) uočeno je produljeno smanjenje IOT *in vivo* na oku kunića. Također je u ispitivanjima *ex vivo* na rožnici goveda opažena značajno bolja penetracija ciklosporina A iz PACA nanosfera koje su prethodno dispergirane u kiselom gelu poliakrilnog polimera (4).

Tablica 2. Primjeri nanočestica druge generacije za lokalnu oftalmičku primjenu (4).

polimer za oblaganje	građa nanočestica	uklopljeni lijek ili obilježivač	rezultati ispitivanja <i>in vivo</i>
poliakrilna kiselina	albuminske nanosfere	pilokarpin	produljeno smanjenje IOT i trajanje mioze
kitozan	^b PECL nanokapsule	indometacin	poboljšana bioraspoloživost: povećana koncentracija lijeka u rožnici i očnoj vodici
		rodamin B	produljeno zadržavanje na površini oka
hijaluronska kiselina	^b PECL nanosfere		nepoznato
^a PEG	^c PACA nanosfere	aciklovir	poboljšana bioraspoloživost: povećana koncentracija lijeka u očnoj vodici
	^d PLA nanosfere	aciklovir	poboljšana bioraspoloživost: povećana koncentracija lijeka u očnoj vodici
	^b PECL nanokapsule	rodamin B	penetracija nanokapsula kroz epitelni sloj rožnice

^aPEG: poli(etilenglikol); ^bPECL: poli-ε-kaprolakton; ^cPACA: poli(alkilcijanoakrilat); ^dPLA: poli(mliječna kiselina).

Oblaganje polisaharidima

Mukoadhezivni polisaharidi (hijaluronska kiselina, kitozan) opisani su kao polimeri za izradu nanočestica prve generacije. Barbault-Foucher i suradnici (11) prvi su izradili

PECL nanosfere obložene hijaluronskom kiselinom za oftalmičku primjenu lijeka. Hijaluronska kiselina oblaže površinu PECL nanosfera adsorpcijom, ionskim međudjelovanjima i umrežavanjem polimernih lanaca.

Kitozan je također ispitan kao polimer za oblaganje nanočestica. Tako PECL nanosfere obložene kitozonom značajno povećavaju permeaciju uklopljenog ^{14}C -indometacina u rožnicu oka kunića u usporedbi s PECL nanosferama obloženim poli-L-lizinom. PECL nanokapsule obložene kitozonom s uklopljenim rodaminom povećano penetriraju kroz rožnicu u usporedbi s penetracijom slobodnog rodamina ili penetracijom rodamina u kombinaciji s praznim nanokapsulama zbog povećanog zadržavanja PECL nanokapsula na površini mukoznog sloja (4).

Oblaganje polietilenglikolom

Cilj oblaganja nanočestica polietilenglikolom (PEG) povećanje je njihove stabilnosti na površini oka. Naime, vezanjem nanočestica s enzimima i proteinima (npr. lizozimom) prekornealnog suznog filma i suzne tekućine smanjuje se njihova stabilnost najčešće zbog agregacije. PEG je često korišten za sprječavanje međudjelovanja nanosustava i proteina.

Fresta i suradnici (12) prvi su oblagali nanosfere PEG. Aciklovir uklopljen u PACA nanosfere obložene PEG ima bolju bioraspodjelivost u usporedbi s vodenom suspenzijom aciklovira ili fizičkom smjesom aciklovira i praznih PACA nanosfere obloženih PEG. Također je opaženo povećanje bioraspodjelivosti aciklovira uklopljenog u PLA nanosfere obložene PEG zbog njegovog učinka na stabilnost nanosfera na površini oka. Oblaganje PEG sprječava agregaciju PLA nanosfera u prisutnosti lizozima (12).

S ciljem boljeg uvida u međudjelovanja PEG obloženih nanočestica s rožnicom oka, uspoređivane su PEG obložene PECL nanokapsule s PECL nanokapsulama bez PEG te kitozonom obloženim PECL nanokapsulama. Sve pripravljene nanokapsule penetriraju kroz epitel rožnice, ali s različitom dubinom penetracije: PEG obložene PECL nanokapsule > neobložene PECL nanokapsule > kitozonom obložene PECL nanokapsule (14). PEG obložene PECL nanokapsule najbolje penetriraju u epitel rožnice zbog njihove poboljšane stabilnosti u suznoj tekućini i prekornealnom suznom filmu. Iako oblaganje kitozonom značajno povećava stabilnost koloidnih čestica u prisustvu proteina i enzima (13), kitozonom obložene PECL nanokapsule zadržavaju se na površini epitela rožnice najvjerojatnije zbog njihovih mukoadhezivnih svojstava.

Nanočestice obložene hidrofiličnim polimerima povećane su stabilnosti i/ili mukoadhezivnih svojstava. Povećanjem mukoadhezije nanočestica povećava se njihovo nakupljanje na površini oka, a moguće je očekivati povećanje i/ili produljenje kornealne permeacije nekih lijekova. Oblaganjem nanočestica odgovarajućim polimerom može se značajno utjecati na međudjelovanja nanočestica s rožnicom oka i na njihovu dubinu penetracije kroz epitel rožnice.

Treća generacija nanočestica

Treća generacija nanočestica obuhvaća funkcionalizirane nanočestice s promijenjenim svojstvima površine. Površina nanočestica mijenja se specifičnim funkcionalnim skupinama koje su odgovorne za usmjeravanje nanočestica na ciljano mjesto u oku.

Lektini predstavljaju zanimljiv izbor za ciljano vezanje nanočestica na sluznicu oka. Lektini su glikoproteini koji prepoznaju i reverzibilno se vežu za specifične skupine ugljikohidrata smještene na površini epitelnih stanica rožnice i mucina prekornealnog suznog filma. Razlikuju se od uobičajenih mukoadhezivnih tvari koje nespecifično reagiraju s mukusom ili jednostavno prijanjaju na sluznicu. Molekule vrlo slične lektinima odgovorne su za adheziju mikroorganizama na površinu sluznica. Lektini se mogu specifično vezati na površinu rožnice, spojnice i sastavne dijelove prekornealnog suznog filma. U ovome trenutku nema podataka o funkcionaliziranim nanočesticama s lektinima kao terapijskim sustavima za primjenu u oftalmologiji (4).

Monoklonska antitijela sljedeća su zanimljiva skupina za izradu funkcionaliziranih nanočestica. Vezanjem monoklonskog antitijela (anti-glikoproteina D iz Herpes simplex virusa) na liposome pripremljeni su imunoliposomi koji se selektivno vežu za stanice rožnice inficirane Herpes simplex virusom (4).

PEG obložene nanočestice prikladne su za vezanje lektina (15) i monoklonskih antitijela (16), a ciljani učinak nanočestica obloženih polisaharidima moguće je postići vezanjem različitih razgranatih liganada (4).

NANOČESTICE ZA SUBKONJUNKTIVALNU PRIMJENU LIJEKA

U slučajevima nemogućnosti osiguranja terapijske koncentracije lijeka lokalnom primjenom na površinu oka, rabi se subkonjunktivalni način primjene. Subkonjunktivalno se lijek primjenjuje pod epitel spojnice od kojeg difundira kroz bjeloočnicu do unutrašnjih segmenata oka. Loša prihvatljivost bolesnika ograničenje je ovog načina primjene.

Ispitivanja subkonjunktivalne primjene mikro- i nanočestica nisu rezultirala poboljšanjem učinka uklopljenog lijeka. Subkonjunktivalna primjena PLGA mikrosfera s uklopljenim ciklosporinom nije rezultirala poboljšanim učinkom ciklosporina. Nanočestice s uklopljenim lijekom relativno su neispitane u smislu subkonjunktivalne primjene (4). Subkonjunktivalno primijenjene fluorescentne mikro- (2 μm) i nanočestice (200 nm) ne prolaze bjeloočnicu već se zadržavaju ispod epitela spojnice (17).

NANOČESTICE ZA INTRAVITREALNU PRIMJENU LIJEKA

Bolesti stražnjih segmenata oka većinom su kronične i zahtijevaju dugotrajnu terapiju. Kronične bolesti stražnjeg segmenta oka glavni su uzrok sljepoće u razvijenom svijetu. Osiguravanje terapijske koncentracije lijeka u unutarnjim segmentima oka cilj je uspješne terapije, npr. proliferativne vitreoretinopatije, endoftalmitisa, periodičnog uveitisa, akutne nekroze mrežnice, neovaskularizacije žilnice, citomegalovirusnog retinitisa. U takvim oboljenjima oka lijek se primjenjuje intravitrealno. Nedostaci intravitrealne primjene su: (i) loša prihvatljivost bolesnika, (ii) brzo uklanjanje lijeka iz staklaste tekućine u sistemsku cirkulaciju preko drenaže očne vodice i aktivnim izlučivanjem putem mrežnice, (iii) mogući toksični učinci na mrežnici, (iv) rizici zamućenja staklaste tekućine, odvajanja mrežnice, oštećenja leće i endoftalmitis (4).

Vitrasert[®] je komercijalno dostupan intraokularni implantat s produljenim oslobađanjem ganciklovira odobren za primjenu u bolesnika s citomegalovirusom (CMV).

Vitrasert[®] je spremišni terapijski sustav s jezgrom građenom od magnezijevog stearata u koju je uklopljen lijek, a obložen je polimerom etilenvinilacetata. Nedostatak ovog implantata je nužnost njegovog kirurškog uklanjanja, te endoftalmitis, odvajanje mrežnice, pomicanje implantata u oku i niske koncentracije lijeka intravitrealno zbog suprakoroidalnog (iznad žilnice) smještaja (4).

U usporedbi s implantatima, prednost biorazgradivih mikro- i nanočestica je intraokularna primjena bez kirurškog postupka. Velika su očekivanja od mikro- i nanočestice građenih od biorazgradivih poliestera PLGA, a zbog dokazane biorazgradivosti, podnošljivosti i učinkovitosti PLGA intraokularnih implantata (18). PLGA nanosfere zadržavaju se unutar stanica pigmenata mrežnice do 4 mjeseca nakon primjene (19) što upućuje na mogućnost intraokularne primjene nanočestica kao unutarstaničnih terapijskih sustava s kontroliranim oslobađanjem lijeka. Istodobno, ispitivanja na štakorima *in vivo* pokazuju dobru okularnu podnošljivost PLGA nanosfera nakon intravitrealne primjene (19). PLGA nanočestice ispituju se i kao terapijski sustavi za primjenu gena u stražnji segment oka (20). PLGA nanočestice s vezanim plazmidom, nositeljem gena za crveni fluorescentni protein (RNFP) injektirane su u šupljinu staklastog tijela kunića. Značajna ekspresija RNFP u epitelnim stanicama pigmenata mrežnice posljedica je fagocitoze nanočestica i dostave plazmida u stanice.

Mogući problemi intravitrealne primjene mikro- i nanočestica odnose se na njihovu stabilnost u staklastoj tekućini. Iako je stabilnost mikro- i nanočestica pri takvim specifičnim uvjetima relativno neispitivana, realno je za očekivati procese aglomeracije zbog međudjelovanja s proteinima staklaste tekućine. Povećanje stabilnosti poli(heksadecil-cijanoakrilatnih) nanočestica u staklastoj tekućini postignuto je oblaganjem PEG (21). PEG obložene nanočestice s uklopljenim tamoksifenom pokazuju obećavajuće rezultate ispitivanja *in vivo* u liječenju pokusnog autoimunog uveitisa. Buduća primjena takvih nanočestica ovisiti će o njihovoj okularnoj podnošljivosti i biorazgradivosti.

Albuminske (nopolimerne) nanočestice također su ispitivane kao terapijski sustav za intraokularnu primjenu lijeka. Okularna toksičnost albuminskih nanočestica s uklopljenim ganciklovirom ispitivana je na štakoru *in vivo* nakon intravitrealne primjene. Unatoč zadržavanju ispitivanih nanočestica u šupljini staklastog tijela dva tjedna nakon primjene, nisu opažene promjene tkiva oka što govori o njihovoj dobroj okularnoj podnošljivosti (22).

Zaključno se može reći da su potrebna daljnja ispitivanja nanočestica za intravitrealnu primjenu da bi se procijenili bitni čimbenici njihove stabilnosti, intraokularne raspodjele, biokompatibilnosti te okularne toksičnosti i podnošljivosti.

ZAKLJUČAK

Glavni je problem oftalmičke primjene lijeka osiguravanje terapijske koncentracije lijeka na ciljanoj mjestu učinka u određenom vremenu. Ciljano mjesto učinka lijeka je površina oka ili unutarnji segment oka. Broj lijekova raspoloživih za liječenje oboljenja oka ograničen je barijerama koje je potrebno prevladati da bi se doseglo ciljano mjesto učinka.

Nanočestice pružaju velike mogućnosti prevladavanja barijera oka, a jednostavno se primjenjuju u obliku kapi za oči. Ovisno o polimernoj građi nanočestice se zadržavaju na sluznici oka i oslobađaju uklopljene lijekove u određenom vremenu, čime se može poboljšati i produljiti terapijski odgovor i smanjiti sistemske nuspojave.

Izborom polimera za oblaganje nanočestica moguće je prilagoditi opseg međudjelovanja nanočestica s rožnicom te dubinu njihove penetracije. Pored učinaka povezanih s površinom oka, nanočestice omogućuju poboljšanje intraokularne terapije produljenjem zadržavanja uklopljenog lijeka i/ili njegov ciljani učinak na stanice mrežnice.

U najnovije vrijeme izrađuju se funkcionalizirane nanočestice tako što se na njihovu površinu vežu specifične skupine (npr. lektini, monoklonska antitijela) odgovorne za usmjeravanje na ciljano mjesto. Očekuje se da će iskoraci u ovom području otvoriti novo poglavlje u dijagnostici i liječenju oboljenja oka.

Nanoparticles as ocular drug delivery systems

by I. Pepić, N. Kaić and J. Filipović-Grčić

A b s t r a c t

Despite extensive research in the field, the major problem in ocular drug delivery is the attainment of an optimal drug concentration at the intended site of action for a sufficient period of time. The site of action maybe located on the eye surface or in the inner ocular structures. The important barriers that need to be overcome in order to reach the target site limits not only the number of medications available for the treatment of ocular diseases, but also the extent to which those available can be used without incurring undesirable systemic side effects. From the results described in this chapter, it is possible to conclude that nanoparticles offer great chances of solving these limitations, while still benefiting from their topical administration as eye drops. Indeed, nanoparticles, depending on their composition, are significantly retained on the ocular mucosa, and from this location, they deliver the associated drugs for extended periods of time. This situation normally results in an enhanced and prolonged therapeutic response, and also in a decrease in the side effects. The results reported so far have also evidenced that both the extent of interaction and the penetration depth of the colloidal systems with the cornea, can be modulated by the selection of an appropriate coating. In addition to these beneficial effects associated with the topical ocular administration, nanoparticles offer an interesting potential in terms of improving intraocular drug administration. This potential includes not only the prolongation of the residence time of drugs in the eye, but also their targeting to the retinal cells. Finally, significant efforts are currently underway to develop highly sophisticated nanoparticles functionalized with specific targeting ligands (i.e. lectins and antibodies). Advances in this area are expected to open new avenues for the diagnostic and therapy (including gene therapy) of ocular disorders.

Literatura – References

1. Pepić I. Problemi lokalne primjene pripravaka za oči. *Farm Glas.* 2004; 60:311–329.
2. De la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev.* 2010; 62:100–117.
3. Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J Control Rel.* 2009; 136:2–13.
4. Alonso MJ, Sanchez A. Nanoparticulate Carriers for Ocular Drug Delivery. In: Torchilin VP. *Nanoparticulates as drug carriers.* London; Imperial College Press, 2006.
5. Gurny R. Preliminary study of prolonged acting drug delivery systems for the treatment of glaucoma. *Pharm Acta Helv.* 1981; 56:130–132.
6. Zimmer A, Kreuter J, Robinson JKJ. Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues. *J Microencapsulation.* 1991; 8:497–504.
7. Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials.* 2002; 23: 3247–3255.
8. Hsiue GH, Hsu SH, Yang CC, Lee SH, Yang IK. Preparation of controlled release ophthalmic drops. *Biomaterials.* 2002; 23:457–462.
9. Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, Lee VHL, Fresta M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded nanospheres. *Pharm Res.* 2003; 20:584–590.
10. Diebold Y, Salamanca AE, Jarrin M, Calonge M, Vila A, Carvalho ELS, Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Nanotechnologies for ocular surface disorders. *Ocular surface.* 2005; 3:S56.
11. Barbault-Foucher S, Gref R, Russo P, Guechot J, Bochot A. Design of poly-E-caprolactone nanospheres. *J Control Rel.* 2002; 83:365–375.
12. Fresta M, Fontana G, Bucolo C, Cavallaro G, Giammona G, Puglisi G. Ocular tolerability and in vivo bioavailability of PEG coated nanospheres. *J Pharm Sci.* 2001; 90:288–297.
13. Vila A, Sanchez A, Tobio M, Calvo P, Alonso MJ. Design of the biodegradable particles. *J Control Rel.* 2002; 78:15–24.
14. De Campos AM, Sanchez A, Gref R, Calvo P, Alonso MJ. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carriers with the ocular mucosa. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 20:73–81.
15. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 1994; 263:1600–1603.
16. Olivier JC, Huertas R, Lee HJ, Calon F, Pardridge WM. Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm Res.* 2002; 19:1137–1143.

17. Amrite AC, Ayalasomayajula SP, Kompella UB. Ocular distribution of intact nano and microparticles. *Drug Del Tech.* 2003; 3:62-67.
18. Herrero-Vanrell R, Refojo MF. Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev.* 2001; 52:5-16.
19. Bourges JL, Gautier SE, Delie F, Bejjani RA, Jeanny JC, Gurny R, Benezra D, Behar Cohen FF. Ocular drug delivery targeting the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44:3562-3569.
20. Bejjani RA, Benezra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny JC, Gollomb G, Behar-Cohen FF. Nanoparticles for gene delivery. *Mol Vis.* 2005; 17:124-132.
21. Kozak Y, Andrieux K, Villarroja H, Klein C, Thillaye-Goldenberg B, Naud MC, Garcia E, Couvreur P. Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles. *Eur J Immunol.* 2004; 34:3702-3712.
22. Merodio M, Irache JM, Valamanesh F, Mirshahi M. Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats. *Biomaterials.* 2002; 23:1587-1594.

Primljeno 25. studenoga 2010.