

Uspostava postupka za određivanje stupnja hemolize

Benc, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:340366>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Nikolina Benc

**Uspostava postupka za određivanje stupnja
hemolize**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Karmeli Barišić na stručnom vodstvu i pomoći tijekom pisanja ovog diplomskoga rada te strpljenju za sva moja pitanja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Donatelli Verbanac na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnoga dijela rada.

Posebno zahvaljujem mojoj obitelji na velikoj ljubavi i bezuvjetnoj podršci tijekom svih godina studiranja.

Zahvaljujem mojim prijateljima za druženja i dijeljenje svih dobrih, ali i teških trenutaka.

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Hemoliza | 2 |
| 1.1.1. <i>In Vivo</i> hemoliza | 2 |
| 1.1.2. Toksični učinak slobodnoga hemoglobina | 2 |
| 1.2. Faze ispitivanja lijekova | 4 |
| 1.2.1. Pretklinička ispitivanja | 4 |
| 1.2.1.1. Farmakodinamika - što lijek čini organizmu? | 4 |
| 1.2.1.2. Farmakokinetika - što organizam čini lijeku? | 4 |
| 1.2.1.3. Toksikologija - učinkovit je, ali je li siguran? | 5 |
| 1.2.2. Klinička ispitivanja | 5 |
| 1.2.3. <i>In vitro</i> modeli | 6 |
| 1.3. Ekscipijenti | 7 |
| 1.3.1. Ekscipijenti u parenteralnim formulacijama | 7 |
| 1.3.1.1. Ekscipijenti u liofilizatima | 7 |
| 1.3.1.2. Ekscipijenti u tekućim injekcijama | 7 |
| 1.3.1.3. Ekscipijenti u suspenzijama | 8 |
| 1.3.2. Povezanost fomulacije lijeka s nastankom hemolize eritrocita | 9 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. Uzorci | 14 |
| 3.2. Materijali | 14 |
| 3.3. Određivanje stupnja hemolize | 14 |
| 3.3.1. Određivanje koncentracije hemoglobina | 14 |
| 3.3.1.1. Određivanje koncentracije hemoglobina pune krvi | 15 |
| 3.3.1.2. Određivanje koncentracije hemoglobina tretiranih uzoraka | 15 |
| 3.3.2. Priprema baždarnoga dijagrama za određivanje koncentracije hemoglobina na spektrofotometru Cecil – CE 1011 | 17 |
| 3.3.3. Priprema baždarnoga dijagrama za određivanje koncentracije hemoglobina na čitaču mikrotitarskih pločica VICTOR3 1420 Multilabel Counter | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 5. ZAKLJUČAK | 26 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 6. LITERATURA | 28 |
| 7. SAŽETAK..... | 31 |
| 7.1. Sažetak..... | 32 |
| 7.2. Summary | 33 |
| 8. PRILOZI..... | 34 |
| 8.1. Popis kratica | 35 |
| 9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |

1. UVOD

1.1. Hemoliza

Hemoliza se konvencionalno definira kao oslobađanje hemoglobina i drugih unutarstaničnih sastojaka eritrocita u izvanstaničnu tekućinu. Hemoliza se može pojaviti *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* hemoliza posljedica je različitih stanja i bolesti i čini oko 3,2 % svih hemoliziranih uzoraka. *In vitro* hemoliza je češća i uzrokovana je nepravilnim uzorkovanjem krvi, nepravilnim rukovanjem ili centrifugiranjem (Azman i sur., 2019; Koseoglu i sur., 2011).

1.1.1. In Vivo hemoliza

In vivo (intravaskularna) hemoliza posljedica je preranog razaranja eritrocita što može uzrokovati hemolitičku anemiju koja se javlja kada koštana srž ne može nadomjestiti količinu razorenih eritrocita (Azman i sur., 2019). Hemolitička anemija životno je ugrožavajuće stanje, a uzrok mogu biti različiti stečeni i urođeni poremećaji. Najčešći stečeni poremećaji povezani s hemolitičkom anemijom jesu imunosni i autoimunski poremećaji, određeni tipovi infekcija (npr. Citomegalovirus, malarija, virusi hepatitisa), hipersplenizam, opekotine, teške traume ili naporno vježbanje, tumori krvi, izvantjelesna cirkulacija, prostetički srčani zalisci, diseminirana intravaskularna koagulopatija, hemolitički uremični sindrom, trombotična trombocitopenična purpura te reakcije na lijekove, toksične tvari i transfuziju krvi. Urođeni poremećaji povezani s hemolitičkom anemijom su srpasta anemija, talasemije, sferocitoza, paroksizmalna noćna hemoglobinurija i deficit glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze ili piruvat-kinaze (Lippi i sur., 2018).

1.1.2. Toksični učinak slobodnoga hemoglobina

Primarni akutni patofiziološki odgovor na izvanstanični hemoglobin u plazmi je povišeni krvni tlak te prooksidacijski toksični učinak koji se javlja u vaskularnom i bubrežnom tkivu. Također, dolazi do porasta tlaka u plućnoj arteriji. Tijekom intravaskularne hemolize, dolazi do oslobađanja toksičnih komponenti tipično sadržanih u eritrocitima, hemoglobina i hema, u cirkulaciju. Pretpostavka je da su toksični učinci povezani s hemolizom uzrokovani:

1. ekstravaskularnom translokacijom hemoglobina i drugih komponenti eritrocita;
2. poremećajem u ravnoteži između dušikovog oksida (NO) i reaktivnih kisikovih vrsta (ROS);
3. aktivacijom trombocita i hemostaze;
4. hemom, hemoglobinom i adenzin-trifosfatom (ATP-om) posredovanom aktivacijom urođenog imunskog sustava.

Sustav kojim se ograničava toksični učinak komponenti eritrocita obuhvaća topive proteine plazme, među kojima se najvažnijima smatraju haptoglobin i hemopeksin. Prva linija obrane je haptoglobin koji se ireverzibilno veže za oslobođeni hemoglobin. Rezultirajući kompleks brzo se uklanja iz cirkulacije endocitozom posredovanom receptorima (CD-163 receptori čistači) te razgrađuje u jetri što uzrokuje smanjenje plazmatskoga haptoglobina. Slobodni hemoglobin može nadići taj sustav i uzrokovati pojačanu potrošnju endogenoga NO-a i formiranje methemoglobina. Hemopeksin je protein akutne faze, primarno eksprimiran u jetri, koji veže hem, a nastali se kompleks uklanja endocitozom posredovanom receptorima (Rapido, 2017).

Slobodni hemoglobin i hem mogu uzrokovati vaskularnu disfunkciju i upalu. Prvi mehanizam štetnoga delovanja je poremećaj u ravnoteži između NO-a, važnoga regulatora vazodilatacije i vazokonstrikcije, i ROS-a. NO i oksihemoglobin mogu brzo i ireverzibilno reagirati, ali taj je proces obično ograničen jer hemoglobin nije slobodan nego je odijeljen u eritrocitima. Tijekom intravaskularne hemolize hemoglobin cirkulira slobodan ili u obliku mikrovezikula koje mogu brzo reagirati s NO-om. Pokazalo se da više od 0,01 g/dL slobodnoga hemoglobina u plazmi potencijalno može inhibirati NO-om posredovanu vazodilataciju *in vivo*. Do smanjenja NO-a može doći i drugim mehanizmima. Slobodni hem može uzrokovati potrošnju NO-a i vazokonstrikciju povećanjem ekspresije adhezijskih molekula i aktivacijom endotela te služi kao pro-upalni ligand za receptore urođene imunosti (npr. TLR4). Taj proces potiče regrutaciju upalnih stanica, agregaciju trombocita i oksidaciju lipoproteina male gustoće (engl. *low-density lipoproteins*, LDL). Dodatno, razaranjem eritrocita dolazi do oslobađanja značajne količine enzima arginaze 1. Arginaza 1 može metabolizirati L-arginin u ornitin, čime se smanjuje količina dostupnoga L-arginina nužnoga za sintezu NO-a djelovanjem endotelne sintaze NO-a. Smanjena biodostupnost NO-a uzrokuje vazomotornu nestabilnost, disfunkciju endotela i sistemsku vazokonstrikciju koja rezultira povećanjem sistemskog vaskularnog otpora što dovodi do povećanja sistoličkoga, dijastoličkoga i prosječnoga arterijskog krvnog tlaka sa smanjenim ili nepromijenjenim srčanim minutnim volumenom, smanjene perfuzije bubrega i drugih organa (Rapido, 2017).

Slobodni hemoglobin auto-oksidira u methemoglobin i sudjeluje u pseudoperoksidaznom ciklusu stvarajući ROS. Hem, koji sadrži željezo, također sudjeluje u stvaranju ROS-a Fentonovom reakcijom. *In vitro* pokusi pokazuju da NO inhibira agregaciju trombocita i ekspresiju endotelnih adhezijskih molekula. Posljedično, smanjena biodostupnost NO-a tijekom hemolize može uzrokovati aktivaciju trombocita i sustava hemostaze. NO također utječe na koagulaciju inhibicijom faktora XIII što povećava stabilnost i smanjuje otapanje

ugruška. Eritrociti sadrže i visoke razine adenozin-difosfata (ADP-a) čije oslobađanje može aktivirati trombocite putem P2Y receptora. Hem i hemoglobin mogu posredovati aktivaciji urođenoga imunosnoga sustava što uzrokuje migraciju makrofaga i neutrofila u pluća i oslobađanje neutrofilnih ekstracelularnih zamki (NET). Taj proces inducira aktivaciju upale, tromboze i odlaganje fibrina (Rapido, 2017).

1.2. Faze ispitivanja lijekova

1.2.1. Pretklinička ispitivanja

Svrha pretkliničkih istraživanja jest dati informacije o sigurnosti i učinkovitosti potencijalnoga lijeka prije testiranja na ljudima. Mogu dati dokaze o biološkom učinku ispitivanoga spoja i obično uključuju *in vitro* te *in vivo* ispitivanja. Podatci o doziranju i toksičnim razinama ključni su za procjenu je li opravdano i sigurno nastaviti s kliničkim istraživanjima, a dobivaju se farmakokinetičkim, farmakodinamičkim i toksikološkim istraživanjima (Honek, 2017).

1.2.1.1. Farmakodinamika - što lijek čini organizmu?

Farmakodinamika opisuje odnos između lijeka u organizmu i njegovoga biološkoga učinka (odgovor na vezanje lijeka za ciljnu molekulu tj. receptor). Odgovara na pitanja koliko je učinkovit lijek s obzirom na željeni farmakološki učinak, uključujući sigurnosne aspekte i nuspojave. Farmakodinamika utvrđuje terapijski indeks, omjer toksične doze i efektivne doze. Veliki terapijski indeks ukazuje na veći terapijski interval (Honek, 2017).

1.2.1.2. Farmakokinetika - što organizam čini lijeku?

Učinkovitost lijeka određuje se na temelju količine aktivnoga lijeka prisutne u ciljanom tkivu što ovisi o oslobađanju, apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i ekskreciji (LADME). Farmakokinetika opisuje promjene u plazmatskoj koncentraciji lijeka tijekom vremena kao posljedice LADME. LADME profiliranje važno je za utvrđivanje doza i rasporeda primjene lijeka. Većina lijekova primjenjuje se oralno i moraju se apsorbirati u gastrointestinalnom traktu kako bi ušli u krvotok, a zatim prenijeli do mjesta djelovanja. Na tom putu prolaze kroz jetru i metabliziraju se što posljedično uzrokuje smanjenu koncentraciju lijeka i biodostupnost. Intravenskom primjenom zaobilazi se efekt prvoga prolaska kroz jetru pa je biodostupnost veća. Distribucija lijeka ovisi o afinitetu lijeka za vezanje na proteine plazme, molekulskim svojstvima i prokrvljenosti tkiva. Nakon unosa, lijekovi se metaboliziraju kako

bi se izlučili iz organizma, a pritom nastaju farmakološki aktivni oblici ili inertni metaboliti. Kako bi se osigurala dugotrajnost doze i ustaljene koncentracije važno je poznavati kako se lijek eliminira iz organizma. Popratne bolesti, način života i dob mogu utjecati na eliminaciju te se često ispituju u kasnijim fazama kliničkih ispitivanja. Kada je brzina eliminacije jednaka apsorpciji postiže se stabilno stanje. Održavanje stabilnoga stanja je poželjno i postiže se opetovanim doziranjem. Naposljetku, lijek i njegovi metaboliti izluče se uglavnom kroz urin ili feces (Honek, 2017).

1.2.1.3. Toksikologija - učinkovit je, ali je li siguran?

Kako bi se utvrdila sigurnost lijeka za testiranje na ljudima provode se toksikološka ispitivanja kojima se određuje plan liječenja s najmanjim stupnjem toksičnosti, a time i prikladna i sigurna početna doza za klinička ispitivanja. Dodatno, mogu se koristiti za uspostavljanje biljega za praćenje nuspojava. Počinju ispitivanjima s primjenom jedne doze lijeka kako bi se utvrdili organi koji su potencijalne mete toksičnoga djelovanja, a nastavljaju ispitivanjima primjenom više doza u *in vivo* studijama. Druga ispitivanja procjenjuju karcinogeničnost, genotoksičnost i reproduktivnu toksičnost. Genotoksični učinak obično se ispituje na temelju potencijala da izazove mutacije u gljivicama u *in vitro* sustavu. Ispitivanja karcinogeničnosti i reproduktivne toksičnosti uobičajeno uključuju štakore. Tumorigeni učinak može biti vidljiv samo nakon duljeg vremena pa ispitivanja karcinogeničnosti uključuju kontinuirano davanje lijeka tijekom minimalno 6 mjeseci (Honek, 2017).

1.2.2. Klinička ispitivanja

Klinička ispitivanja provode se kroz nekoliko različitih faza (faze I-IV), počevši od malog broja subjekata koji se proširuje do kohorta (lat. *cohors* - skupina, mnoštvo). Tijekom faze I ispitivanja, ispitivani novi lijek (INL) se prvi puta primjenjuje na ljudima. Rana ispitivanja prve faze (prethodno faza 0) opisuju prva ispitivanja na ljudima gdje mala grupa subjekata, obično 10-15, primi jednu, sub-terapijsku dozu lijeka kako bi se dobili farmakokinetički podatci bez induciranja farmakoloških učinaka. Cilj je tih ispitivanja istražiti djeluje li potencijalni lijek prema očekivanjima dobivenim na temelju pretkliničkih ispitivanja. Ako su uspješna, daljnja istraživanja procjenjuju sigurnost i toleranciju INL-a. Te studije obično uključuju 20-50 zdravih volontera. Utvrđuje se maksimalna podnošljiva doza, najčešće i ozbiljne nuspojave te procjenjuju farmakološka, farmakodinamička i farmakokinetička svojstva (Honek, 2017).

Oko 70 % potencijalnih lijekova pređe iz faze I u fazu II u kojoj se procjenjuje terapijska učinkovitost INL-a. Faza II obično uključuje nekoliko stotina pacijenata s jasno definiranim uključujućim i isključujućim kriterijima. Procjenjuje se odgovor pacijenata na dozu i biološka aktivnost lijeka. Usporedba statusa pacijenta prije i poslije tretmana te odgovora pacijenata koji primaju INL i placebo daju preliminarne podatke o djelotvornosti. Također se prate nuspojave i određuje optimalna doza za fazu III (Honek, 2017).

Oko 1/3 testiranih INL-a prolaze u fazu III koja uključuje 100-500 pacijenata s ciljem potvrđivanja terapijske dobrobiti, sigurnosti i učinkovitosti za predviđenu indikaciju. Koriste se različite doze, populacije i kombinacije s drugim terapijskim agensima kako bi se ispitale indikacije, kontraindikacije, terapijski intervali i nuspojave. Potencijalno se mogu otkriti rijetke i dugoročne nuspojave (Honek, 2017).

Ovisno o rezultatu tijekom faze III istraživanja, 25-30 % INL-a prolazi u fazu IV. To su dugoročna ispitivanja i obično se provode nakon odobrenja od strane regulatornih agencija (post-marketinške studije). Često uključuju više od 10 000 ispitanika relevantne populacije pacijenata s ciljem sakupljanja dodatnih informacija o sigurnosti, učinkovitosti i novim indikacijama. Procjenjuje se učinkovitost u stvarnim uvjetima. Mogu se otkriti jedinstvene nuspojave koje mogu rezultirati micanjem lijeka s tržišta ili pak s druge strane, učinkovitost kod novih indikacija što otvara nova tržišta (Honek, 2017).

1.2.3. *In vitro* modeli

In vitro ispitivanja su relativno brza, jednostavna i povoljna. Koriste kulture stanica, tkiva i organa ili se fokusiraju na određene komponente stanica ili biološke makromolekule. Omogućavaju usku kontrolu i praćenje uvijeta eksperimenta i često daju mehaničke dokaze o načinu djelovanja ispitivane tvari. Nedostatak je taj što se izolirane stanice nužno ne ponašaju kao stanice u organizmu koje su u interakciji s mnoštvom drugih stanica (Honek, 2017).

Određivanje hemolize jedan je od testova koji se provode na početku toksikoloških ispitivanja. Iako su ljudski eritrociti najšišći izbor za preliminarna *in vitro* testiranja, nerijetko se koriste i eritrociti drugih vrsta. Eritrociti se često koriste kao model za stanične membrane sisavaca. Jednostavnost izolacije eritrocita čini ispitivanje hemolitičke aktivnosti svestranim alatom za brzu početnu procjenu toksičnosti te se često koristi u ispitivanjima membranski aktivnih mikrobnih tvari i novih ksenobiotika (Greco i sur., 2020).

1.3. Ekscipijenti

Farmaceutske formulacije lijekova sastoje se od aktivne farmaceutske tvari koja se većinom nalazi u malom postotku i ekscipijenata koji čine većinu formulacije. Ekscipijenti se tradicionalno definiraju kao inaktivni ili inertni sastojci kako bi se razlikovali od farmaceutski aktivnih tvari, međutim, oni nisu inertni. To su tvari koje se dodaju završnom obliku lijeka i imaju specifičnu funkciju. Dodaju se sa ciljem povećanja stabilnosti i očuvanja, povećanja mase, olakšanja proizvodnje, poboljšanja stabilnosti, lakšeg dostavljanja lijeka, prilagođavanja sigurnosti i farmakokinetičkih svojstava. Lijekovi u prosjeku sadrže 4,45 ekscipijenta. Najčešći ekscipijenti su voda (40,4 %), natrijev klorid (38,3 %), polisorbitat 80 (28,7 %), sukroza (24,4 %) i manitol (20,9 %) (Pramanick i sur., 2013; Ionova i sur., 2020).

1.3.1. Ekscipijenti u parenteralnim formulacijama

Parenteralni pripravci sterilni su pripravci namjenjeni za unos putem injekcija, infuzija ili za implantaciju u ljudsko tijelo. Formulirani proizvod mora biti sterilan, bez pirogena i u slučaju otopina, bez čestica. Ne smiju sadržavati tvari za bojanje samo u svrhu bojanja. Preferirano trebaju biti izotonični. Injektirani lijek zaobilazi prirodne obrambene barijere zbog čega je rizik od nuspojava veći i teže je obrnuti učinke (Pramanick i sur., 2013).

1.3.1.1. Ekscipijenti u liofilizatima

Tvari za povećanje volumena tvore glavnu masu liofiliziranog produkta i daju odgovarajuću strukturu. Obično se koriste kod visokopotentnih lijekova koji se primjenjuju u malim dozama i nemaju dovoljan volumen da bi podupirali vlastitu strukturu. Posebice su važni kada ukupna čvrsta masa tvori manje od 2 %. Lioprotekcija se definira kao stabilizacija i prevencija degradacije molekula tijekom suhoga smrzavanja i kasnije tijekom pohrane. Najčešći ekscipijent u liofiliziranim produktima je manitol. Ima jako visoku eutektičnu temperaturu taljenja (-1,4 °C) nakon kristalizacije i dobro se prerađuje u liofilizatima. Kako bi se spriječila degradacija lijeka tijekom obrade, sladištenja i rekonstitucije dodaju se puferi (Pramanick i sur., 2013).

1.3.1.2. Ekscipijenti u tekućim injekcijama

Parenteralni pripravci bi trebali biti izotonični s ljudskom plazmom, ali svi lijekovi u svojim preporučenim dozama nisu. Zbog toga se dodaju tvari za podešavanje toničnosti. Najčešće korištena tvar je dekstroza, a često se koriste manitol i glicerol. Također se dodaju

antioksidansi, antimikrobne i kelatirajuće tvari. Antioksidansi se koriste za sprječavanje/minimaliziranje oksidacijskih reakcija lijeka ili ekscipijenata za vrijeme roka trajanja. Antimikrobne tvari sprječavaju rast mikroorganizama. Najčešće upotrebljavani antioksidansi u sterilnim formulacijama su askorbinska kiselina, acetilcistein, soli sulfurne kiseline, monotioglicerol, itd. Često korištene antimikrobne tvari su fenol, metakrezol, benzilni alkohol, parabeni, benzalkonij klorid, klorobutanol, timerosal, itd. Za otapanje ili povećanje topljivosti lijeka u formulaciji pomažu solubilizirajuće tvari. Ugrubo se mogu podijeliti na surfaktante i ko-otapala. Surfaktanti olakšavaju otapanje tako što smanjuju površinsku napetost sastavnica lijeka, a ko-otapala se definiraju kao otapala koja u sprezi s drugim otapalom omogućavaju otapanje neke tvari. Nekoliko primjera surfaktanta koji se koriste su polioksietilen sorbitan monooleat, lecitin i polioksietilen-polioksietilen kopolimeri. Primjeri ko-otapala su propilen glikol, glicerol, etanol, polietilen glikol, sorbitol, dimetilacetamid, itd. Kako bi se povećala topljivost lijekova u otapalima, posebice vodi, ponekad se koristi kompleksiranje. Učinkovitima za otapanje hidrofobnih tvari pokazali su se klorheksidini. Za parenteralne pripravke poželjno je da pH bude što bliže fiziološkom. Za podešavanje i stabilizaciju pH koriste se puferi. Pritom je važan odabir koncentracije i vrste pufera. Naprimjer, citratni pufer u rasponu od 5-15 mM se obično koristi u formulacijama, ali povećanje koncentracije na 50 mM će uzrokovati snažnu bol nakon subkutane primjene zbog toksičnoga učinka izazvanog kelacijom kalcijevih iona. Najčešće korišteni puferi su fosfatni, citratni i acetatni (Pramanick i sur., 2013).

1.3.1.3. Ekscipijenti u suspenzijama

Parenteralne suspenzije korisne su za primjenu netopivih ili slabo topivih lijekova. Veća površina disperziranog lijeka omogućava visoku dostupnost za apsorpciju. Omogućavaju produljeno oslobađanje s mjesta injektiranja u odnosu na usporedivu otopinu. Tipični ekscipijenti u suspenzijama su flokulirajuće/suspendirajuće tvari, sredstva za vlaženje, sustavi otapala, prezervativi, antioksidansi, kelirajuće tvari, puferi i tvari za podešavanje toničnosti. Kao tvari za vlaženje koriste se različiti neionski surfaktanti i ne-vodena otapala poput glicerina, alkohola i propilen glikola. Sustavi otapala u parenteralnim suspenzijama dijele se na vodene i ne-vodene. Voda za injekcije je preferirani sustav, ali za poboljšanje topivosti i stabilnosti dodaju se tvari koje se miješaju s vodom kao ko-otapala. Primjer tvari koje se miješaju s vodom su etanol, glicerol, propilen glikol (Pramanick i sur., 2013).

1.3.2. Povezanost formulacije lijeka s nastankom hemolize eritrocita

Sve više spojeva dobivenih kod istraživanja lijekova je lipofilno i slabo topljivo u vodi. Kombinacija lipofilnih i neionizabilnih svojstava predstavlja izazov tijekom razvoja formulacija otopina za parenteralnu primjenu. Jedan od pristupa je da se slabo topivi spoj inkorporira u sustav sastavljen od vodenog i organskog otapala (sustav kootapala) kako bi se poboljšala topljivost i moguće stabilnost. Tablica 1 prikazuje nekoliko plasiranih proizvoda s formulacijama koje uključuju sustav kootapala (Amin i sur., 2006).

Tablica 1. Popis ne-vodenih formulacija otopina za IV primjenu (Prilagođeno iz Amin i sur., 2006)

| Naziv lijeka | % u tržišnoj formulaciji | % u primijenjenoj formulaciji ^a |
|---------------|---|---|
| Ciklosporin | 65 % Kremofor EL, 32,9 % EtOH | 3,3 % Kremofor EL, 1,6 % EtOH |
| Diazepam | 40 % PG, 10 % EtOH, 5 % natrijev benzoat i benzojeva kiselina, 1,5 % benzilni alkohol | 40 % PG, 10 % EtOH, 5 % natrijev benzoat i benzojeva kiselina, 1,5 % benzil alkohol |
| Digoksin | 40 % PG, 10 % EtOH | 40 % PG, 10 % EtOH |
| Etopozid | 65 % PEG 300, 30,5 % EtOH, 8 % polisorbat 80,3 % benzilni alkohol | 0,65 % PEG 300, 0,31 % EtOH, 0,08 % polisorbat 80, 0,03 % benzil alkohol |
| Lorazepam | 18 % PEG 400, 80 % PG, 2 % benzil alkohol | 9 % PEG 400, 40 % PG, 1 % benzil alkohol |
| Nitroglicerol | 30 % EtOH, 30 % PG | 2,4 % EtOH, 2,4 % PG |
| Pentobarbital | 40 % PG, 10 % EtOH | 40 % PG, 10 % EtOH |
| Fenitoin | 40 % PG, 10 % EtOH | 40 % PG, 10 % EtOH |

EtOH-etanol; PG-propilen glikol; PEG-polietilen glikol
^aoznačava primjenjeni postotak na temelju najmanjeg volumena razrjeđenja prije IV injekcije

Sustav kootapala mora osiguravati dovoljan kapacitet otapanja kao koncentrat i nakon dilucije, prije injektiranja. Kombinacija kootapala za optimiziranje topljivosti omogućava smanjenje količine pojedinačnih kootapala čime se smanjuje toksičnost povezana s kootapalom. Rezultirajuća formulacija otapala bi također trebala pružiti rok trajanja nužan za komercijalizaciju. Idealni sustav kootapala treba biti bezbolan i uzrokovati minimalnu iritaciju nakon injektiranja. Bol je povezana s hemolizom uzrokovanom intravenskom primjenom lijeka što uzrokuje oslobađanje hemoglobina. Slobodni hemoglobin može uzrokovati vaskularnu iritaciju, flebitis, akutno zatajenje bubrega i u nekim slučajevima smrt.

Neki lijekovi sami po sebi uzrokuju hemolizu, ali ne-vodene formulacije ju također mogu uzrokovati. Zbog toga je važna procjena hemolitičkoga potencijala parenteralnih formulacija. Usprkos važnosti procjene hemolitičkoga potencijala, u literaturi postoje kontradiktorne informacije povezane s hemolitičkim potencijalom različitih kootapala. Te nedosljednosti proizlaze iz razlike u metodama ispitivanja, naročito omjera volumena krvi i otapala, vremena kontakta te statičkih nasuprot dinamičkih metoda testiranja. Dodatno, razlike mogu biti povezane s krvnim stanicama različitih vrsta i njihovoj podložnosti hemolizi. Tablica 2 prikazuje *in vitro* hemolizu u zečjoj, psećoj i ljudskoj krvi u usporedbi s *in vivo* literaturnim podacima kod ljudi (Amin i sur., 2006).

Tablica 2. Detekcija hemolize *in vivo* i *in vitro* metodama (Prilagođeno iz Amin i sur., 2006)

| Sastav formulacije | <i>in vivo</i> literatura | <i>in vitro</i> (% utvrđene hemolize) | | |
|---|---------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| | | Ljudska krv | Zečja krv | Pseća krv |
| Fiziološka otopina (FO) | ne | 0 | 0 | 0 |
| 10 % EtOH u FO | ne | 0 | 0 | 10 |
| 30 % EtOH u FO | ne | 0 | 0 | 2,5 |
| 40 % PG u FO | da | 61 | 37,3 | 29,7 |
| 60 % PG u vodi | da | 100 | 96,7 | 53,4 |
| 10 % PG + 30 % EtOH u FO | ne | 0 | 0 | 0 |
| 10 % EtOH + 20 % PG u vodi | ne | 8,8 | 0 | 0,3 |
| 10 % EtOH + 40 % PG u vodi | da | 69,2 | 52,6 | 31,5 |
| 20 % EtOH + 30 % PEG 400 u vodi | ne | 0 | 0 | 3,3 |
| FO-fiziološka otopina; EtOH-etilni alkohol; PG-propilen glikol; PEG-polietilen glikol | | | | |

Tablica 2. pokazuje *in vitro* hemolizu u zečjoj, psećoj i ljudskoj krvi u usporedbi s ljudskim *in vivo* literaturnim podacima. Tri od devet formulacija izazvalo je hemolizu. 61-100 % hemolize u ljudskoj krvi, 37-97 % u zečjoj i 30-53 % u psećoj krvi. U svim slučajevima veći postotak hemolize vidljiv je u ljudskoj krvi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hemolitička toksičnost može uzrokovati lizu membrane eritrocita i posljedično oslobađanje hemoglobina što dovodi do brojnih akutnih i kroničnih štetnih učinaka. To tipično uključuje žuticu, hepatosplenomegaliju, tahikardiju, ishemiju miokarda, zatajenje bubrega i respiratorno zatajenje, a naposljetku multiorgansku disfunkciju i smrti. Smrtnost može biti visoka, čak do 10 %. Zbog toga je važno procijeniti eventualnu hemolitičku toksičnost novih spojeva u ranoj fazi otkrivanja i razvoja lijekova. Nedavna istraživanja pokazuju da je određivanje koncentracije slobodnog hemoglobina pouzdani marker oštećenja eritrocita. (Lippi i sur., 2018). Cilj ovog rada je uspostava jednostavnoga *in vitro* postupka za procjenu stupnja hemolize eritrocita koji bi se koristio u preliminarnim toksikološkim ispitivanjima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Uzorci su prikupljeni na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Radi se o uzorcima dobrovoljnih davatelja krvi koji su prethodno skenirani na krvlju prenosive zarazne bolesti. Prikupljeni su uzorci pune krvi izvađeni na K₂-EDTA kao antikoagulans, pohranjeni na +4 °C do korištenja.

3.2. Materijali

Triton-X-100 (0,5 %, 1 %, 2 %)

Saponin (1 %, 2 %)

Propilen glikol 60 %

Centrifuga (Hettich Zentrifugen - EBA 12 R)

Spektrofotometar s kivetama (Cecil - CE 1011)

Čitač mikrotitarskih pločica (PerkinElmer - VICTOR3 1420 Multilabel Counter)

3.3. Određivanje stupnja hemolize

Za izazivanje hemolize uzorcima pune krvi dodavani su saponin, triton-X-100 te propilen glikol u različitim koncentracijama. Kao negativna kontrola korištena je fiziološka otopina. Stupanj hemolize može se izračunati iz omjera apsorbancija ili koncentracija hemoglobina prema formuli:

$$\% \text{ hemolize} = \text{apsorbancija tretiranog uzorka} / \text{apsorbancija pune krvi}$$

ili

$$\% \text{ hemolize} = \text{konc. hemoglobina tretirane krvi} / \text{konc. hemoglobina pune krvi}$$

Koncentracije hemoglobina određivane su na dvije vrste analizatora:

1. Spektrofotometru s kivetama (Cecil - CE 1011)
2. Automatskom čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 1420 Multilabel Counter)

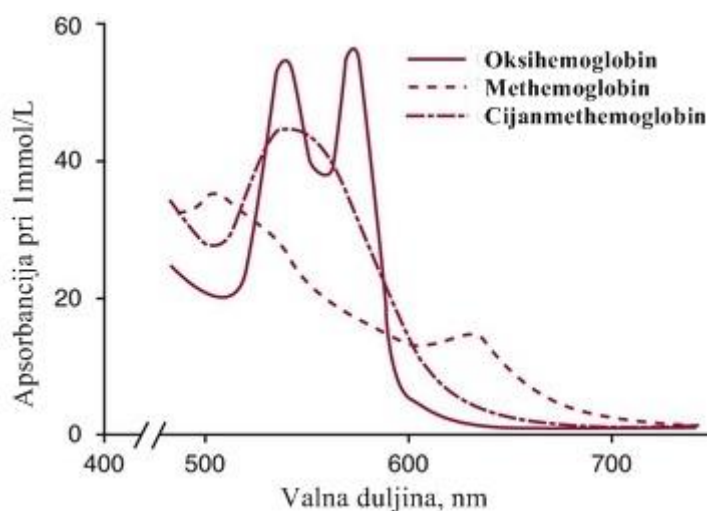
Za svaki analizator napravljen je pripadajući baždarni pravac.

3.3.1. Određivanje koncentracije hemoglobina

Hemoglobin je u uzorcima određen standardnom cijanmethemoglobinskom metodom s Drabkinovim reagensom.

Metoda se temelji na oksidaciji hemoglobina i njegovih derivata (osim sulfhemoglobina) u methemoglobin u prisutnosti alkalnoga kalijevog fericijanida. Methemoglobin reagira s

kalijevim cijanidom pri čemu nastaje cijanmethemoglobin koji ima maksimum apsorbancije pri 540 nm. Apsorbancija uzorka izmjerena na 540 nm proporcionalna je koncentraciji hemoglobina u uzorku. Koncentracije hemoglobina određene su iz standardnih krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji hemoglobina.



Slika 1. Apsorpcijski spektar oksihemoglobina, methemoglobina i cijanmethemoglobina (preuzeto i prilagođeno s: <https://basicmedicalkey.com/hemoglobin-iron-and-bilirubin>, pristupljeno 21. 6. 2021.)

3.3.1.1. Određivanje koncentracije hemoglobina pune krvi

10 μL pune krvi dodano je u 2,5 mL Drabkinovog reagensa. Ostavljeno da stoji 15 minuta, a zatim očitana apsorbancija na 540 nm. Uzorci 1-7 u triplokatu za očitavanje na spektrofotometru. Uzorci 8-13 u duplikatu za očitavanje na čitaču mikrotitarskih pločica.

3.3.1.2. Određivanje koncentracije hemoglobina tretiranih uzoraka

Kao negativna kontrola korištena je fiziološka otopina. Za svaki uzorak krvi 250 μL fiziološke otopine dodano je u 250 μL pune krvi.

Pripremljene su otopine prikazane u tablici 3 konačnog volumena 500 μL . Uzorci 1-7 u triplokatu za očitavanje na spektrofotometru. Uzorci 8-13 u duplikatu za očitavanje na čitaču mikrotitarskih pločica.

Tablica 3. Priprema hemoliziranih uzoraka krvi

| broj uzorka | dodana tvar | volumen tritona (mL) | volumen saponina (mL) | volumen pune krvi (mL) | konačni udio dodane tvari |
|-------------|------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|
| 1 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (1 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 2 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (1 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 3 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (1 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 4 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (2 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 5 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (2 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 6 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (2 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 7 | triton (1 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,50 % |
| | saponin (2 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 0,50 % |
| 8 | triton (0,5 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,25 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |
| 9 | triton (0,5 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,25 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |
| 10 | triton (0,5 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,25 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |
| 11 | triton (0,5 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,25 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |
| 12 | triton (2 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 1 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |
| 13 | triton (2 %) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 1 % |
| | propilen glikol (60 %) | 0,00 | 0,25 | 0,25 | 30 % |

Priređene otopine inkubirane su 5 min na 37 °C, a zatim centrifugirane 15 min na 5900 okretaja u minuti. Nakon centrifuge otpipetirano je 10 µL supernatanta u epruvetu i dodano 2,5 mL Drabkinovog reagensa. Priređene otopine ostavljene su 15 min na sobnoj temperaturi nakon čega je spektrofotometrom izmjerena apsorbancija na 540 nm.

3.3.2. Priprema baždarnoga dijagrama za određivanje koncentracije hemoglobina na spektrofotometru Cecil – CE 1011

Za pripremu baždarnoga dijagrama potreban je standard hemoglobina poznate koncentracije iz kojeg se napravi niz razrijeđenja. Priređenim razrjeđenjima izmjeri se apsorbanacija, a zatim iz dobivenih vrijednosti apsorbanacija i poznatih koncentracija konstruira baždarni dijagram. Standard hemoglobina pripremljen je iz *poola* eritrocita 4 uzorka krvi. Uzorci krvi centrifugirani su 15 minuta na 3500 okretaja. Nakon centrifuge plazma je uklonjena, a talozi koji sadrže eritrocite prebačeni su u zasebnu epruvetu. Eritrocitima je dodana voda kako bi došlo do lize stanica, a zatim su pohranjeni u zamrzivač na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja.

Za određivanje koncentracije standarda hemoglobina uzorak *poola* eritrocita centrifugiran je 15 minuta na 3500 okretaja. Nakon centrifuge, supernatant sadrži hemoglobin oslobođen iz eritrocita. 20 μL supernatanta dodano je 5 mL Drabkinovog reagensa, a zatim izmjerena apsorbanacija pri 540 nm. Koncentracija hemoglobina određena je iz već postojeće baždarne krivulje i iznosila je 14 g/L.

Iz priređenog standarda pripremljen je niz otopina u triplikatu prema tablici 4.

Tablica 4. Priprema razrijeđenja standarda hemoglobina

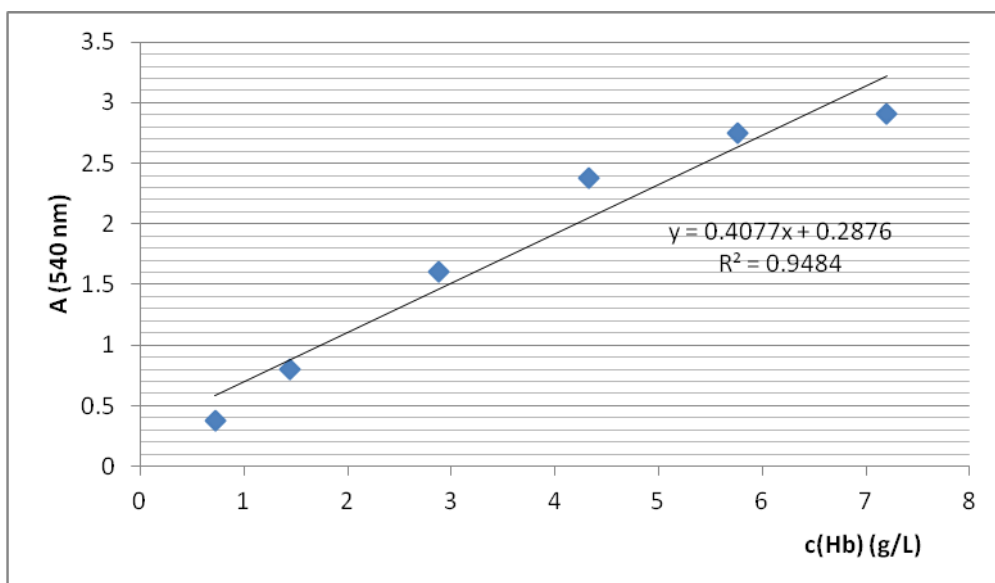
| | SP | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|---|------|------|------|------|------|------|-----|
| V (standard Hb) (μL) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| V (Drabkinov reagens) (μL) | 1000 | 950 | 900 | 800 | 700 | 600 | 500 |
| C (hemoglobin) (g/L) | 0 | 0,72 | 1,44 | 2,88 | 4,32 | 5,76 | 7,2 |

Kao slijepa proba korišten je Drabkinov reagens. Ukupni volumen otopina iznosi 1 mL. Priređenim otopinama izmjerena je apsorbanacija na spektrofotometru pri 540 nm, a vrijednosti apsorbanacija prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Vrijednosti apsorbanacija priređenih razrijeđenja hemoglobina

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| c(Hb) (g/L) | 0,72 | 1,44 | 2,88 | 4,32 | 5,76 | 7,20 |
| A (540 nm) | 0,376 | 0,804 | 1,607 | 2,378 | 2,747 | 2,913 |

Iz dobivenih vrijednosti apsorbanacija i poznatih koncentracija hemoglobina napravljen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji hemoglobina.



Slika 2. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hemoglobina

3.3.3. Priprema baždarnoga dijagrama za određivanje koncentracije hemoglobina na čitaču mikrotitarskih pločica VICTOR3 1420 Multilabel Counter

Standard hemoglobina dobiven je iz KBC Sestre milosrdnice. Koncentracija standard hemoglobina iznosila je 3,5 g/L. Pripremljen je niz otopina standarda hemoglobina u triplikatu prema tablici 6.

Tablica 6. Priprema razrijeđenja standarda hemoglobina

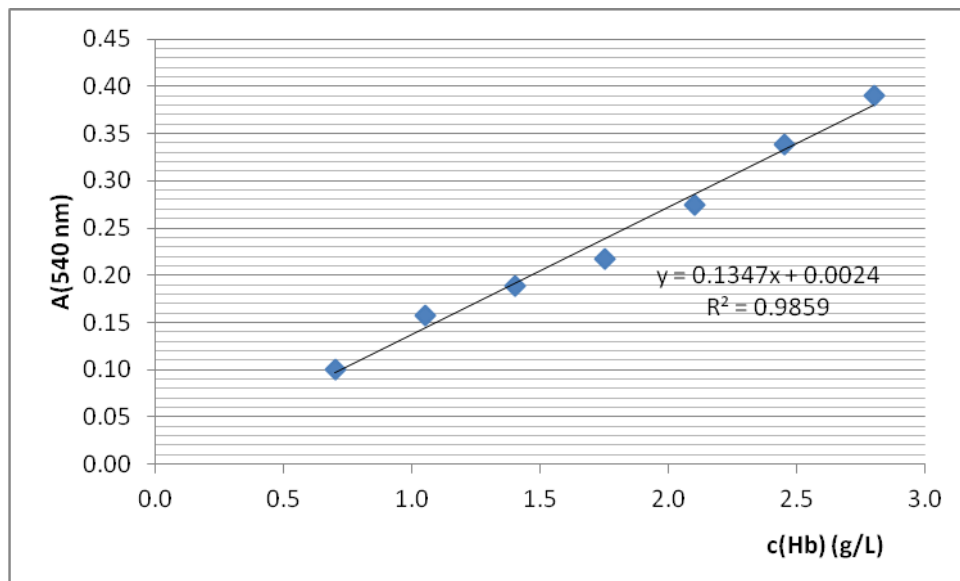
| | SP | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 |
|----------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| V (standard Hb) (μL) | 0 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
| V (Drabkinov reagens) (μL) | 100 | 80 | 70 | 60 | 50 | 40 | 30 | 20 |
| c(hemoglobin) (g/L) | 0 | 0,7 | 1,05 | 1,4 | 1,75 | 2,1 | 2,45 | 2,8 |

Kao slijepa proba korišten je Drabkinov reagens. Ukupni volume otopina je 100 μL. Priređene otopine otpipetirane su u mikrotitarsku pločicu na predviđene pozicije, a zatim je izmjerena apsorbancija na automatskom čitaču mikrotitarski pločica pri 540 nm. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Vrijednosti apsorbancija priređenih razrijeđenja hemoglobina

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| c(Hb) (g/L) | 0,70 | 1,05 | 1,40 | 1,75 | 2,10 | 2,45 | 2,80 |
| A (540 nm) | 0,664 | 1,014 | 1,364 | 1,714 | 2,064 | 2,414 | 2,764 |

Iz dobivenih vrijednosti apsorbancija i poznatih koncentracija napravljen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji hemoglobina.



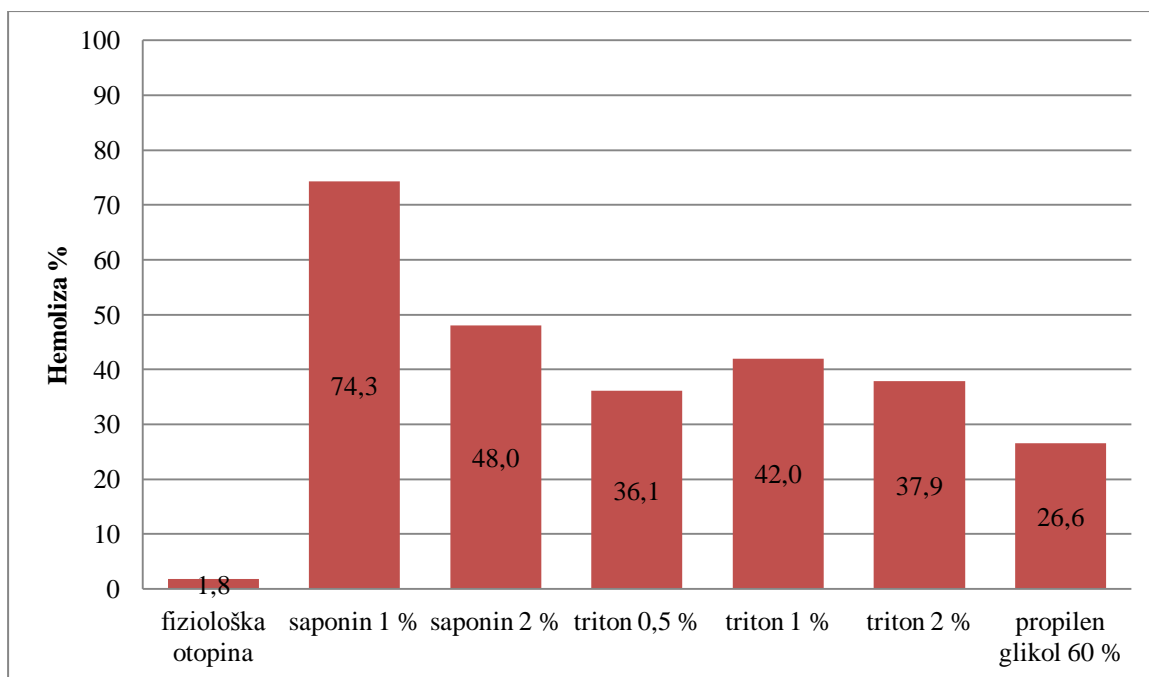
Slika 3. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji hemoglobina

4. REZULTATI I RASPRAVA

U tablici 8 prikazane su izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka nakon izazivanja hemolize. Izračunata je aritmetička sredina te postotak hemolize.

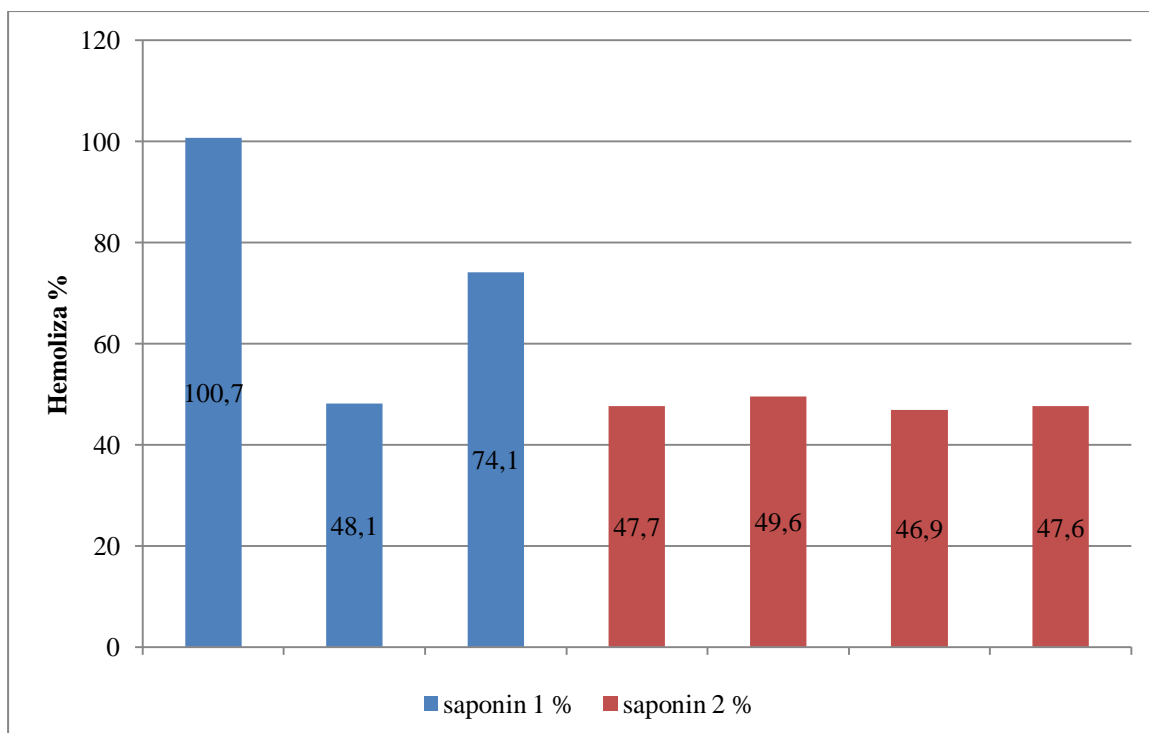
Tablica 8. Dobivene vrijednosti stupnja hemolize izazvane dodatkom saponina, tritona-X-100 i propilen glikola

| | | A1 | A2 | A3 | \bar{A} | % hemolize |
|----|------------------------|-------|-------|-------|-----------|------------|
| 1 | fiziološka otopina | 0,010 | 0,010 | 0,015 | 0,012 | 4,1 |
| | triton(1 %) | 0,135 | 0,125 | 0,170 | 0,143 | 49,8 |
| | saponin(1 %) | 0,260 | 0,310 | 0,300 | 0,290 | 100,7 |
| 2 | fiziološka otopina | 0,010 | 0,020 | 0,025 | 0,018 | 4,3 |
| | triton(1 %) | 0,139 | 0,170 | 0,175 | 0,161 | 37,5 |
| | saponin(1 %) | 0,210 | 0,180 | 0,230 | 0,207 | 48,1 |
| 3 | fiziološka otopina | 0,030 | 0,020 | 0,030 | 0,027 | 9,2 |
| | triton(1 %) | 0,155 | 0,130 | 0,160 | 0,148 | 51,1 |
| | saponin(1 %) | 0,210 | 0,225 | 0,210 | 0,215 | 74,1 |
| 4 | fiziološka otopina | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,0 |
| | triton(1 %) | 0,155 | 0,155 | 0,145 | 0,152 | 34,5 |
| | saponin(2 %) | 0,200 | 0,210 | 0,220 | 0,210 | 47,7 |
| 5 | fiziološka otopina | 0,010 | 0,000 | 0,010 | 0,007 | 1,4 |
| | triton(1 %) | 0,175 | 0,185 | 0,175 | 0,178 | 37,9 |
| | saponin(2 %) | 0,230 | 0,230 | 0,240 | 0,233 | 49,6 |
| 6 | fiziološka otopina | 0,000 | 0,005 | 0,005 | 0,003 | 0,9 |
| | triton(1 %) | 0,135 | 0,135 | 0,135 | 0,135 | 38,0 |
| | saponin(2 %) | 0,160 | 0,170 | 0,170 | 0,167 | 46,9 |
| 7 | fiziološka otopina | 0,005 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,4 |
| | triton(1 %) | 0,200 | 0,195 | 0,210 | 0,202 | 45,3 |
| | saponin(2 %) | 0,200 | 0,220 | 0,215 | 0,212 | 47,6 |
| 8 | fiziološka otopina | 0,000 | 0,000 | / | 0,000 | 0,0 |
| | triton(0.5 %) | 0,124 | 0,173 | / | 0,149 | 39,3 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,093 | 0,070 | / | 0,082 | 21,6 |
| 9 | fiziološka otopina | 0,001 | 0,000 | / | 0,001 | 0,2 |
| | triton(0.5 %) | 0,122 | 0,141 | / | 0,132 | 52,8 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,072 | 0,090 | / | 0,081 | 32,5 |
| 10 | fiziološka otopina | 0,002 | 0,002 | / | 0,002 | 0,5 |
| | triton(0.5 %) | 0,092 | 0,110 | / | 0,101 | 27,7 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,083 | 0,083 | / | 0,083 | 22,7 |
| 11 | fiziološka otopina | 0,001 | 0,000 | / | 0,001 | 0,2 |
| | triton(0.5 %) | 0,069 | 0,063 | / | 0,066 | 24,4 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,025 | 0,096 | / | 0,061 | 22,3 |
| 12 | fiziološka otopina | 0,003 | 0,003 | / | 0,003 | 0,9 |
| | triton(2 %) | 0,111 | 0,120 | / | 0,116 | 35,5 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,107 | 0,093 | / | 0,100 | 30,8 |
| 13 | fiziološka otopina | 0,003 | 0,004 | / | 0,004 | 1,0 |
| | triton(2 %) | 0,130 | 0,147 | / | 0,139 | 40,3 |
| | propilen glikol (60 %) | 0,120 | 0,085 | / | 0,103 | 29,8 |

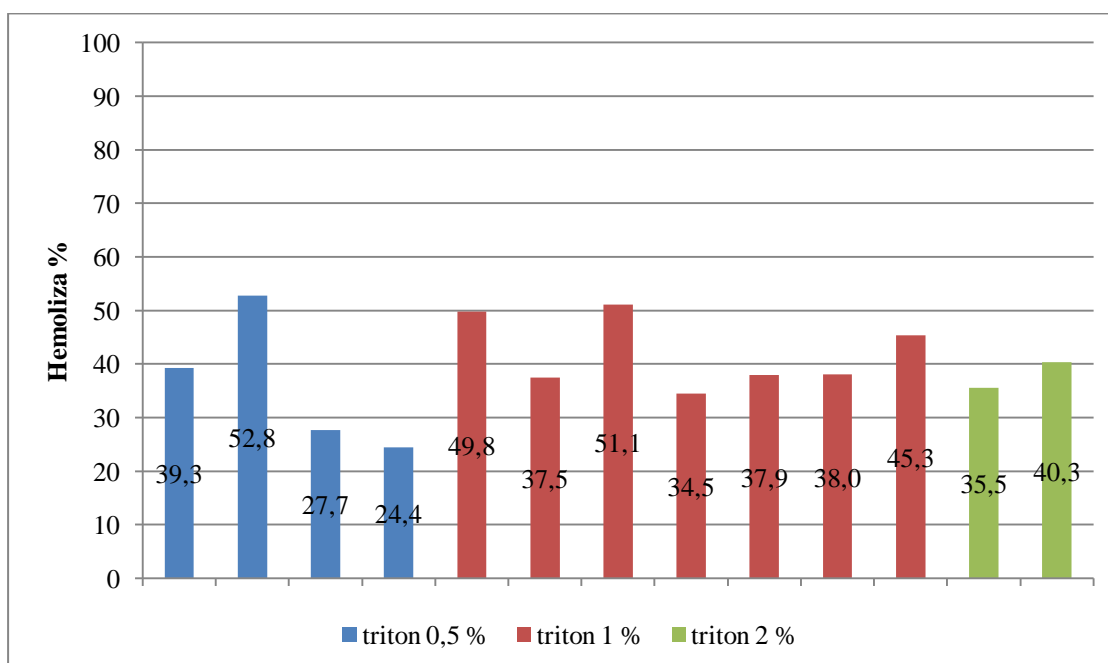


Slika 4. Hemoliza prisutna u uzorcima izazvana dodatkom fiziološke otopine, saponina, triton-X-100 i propilen glikola. Prikazane su srednje vrijednosti.

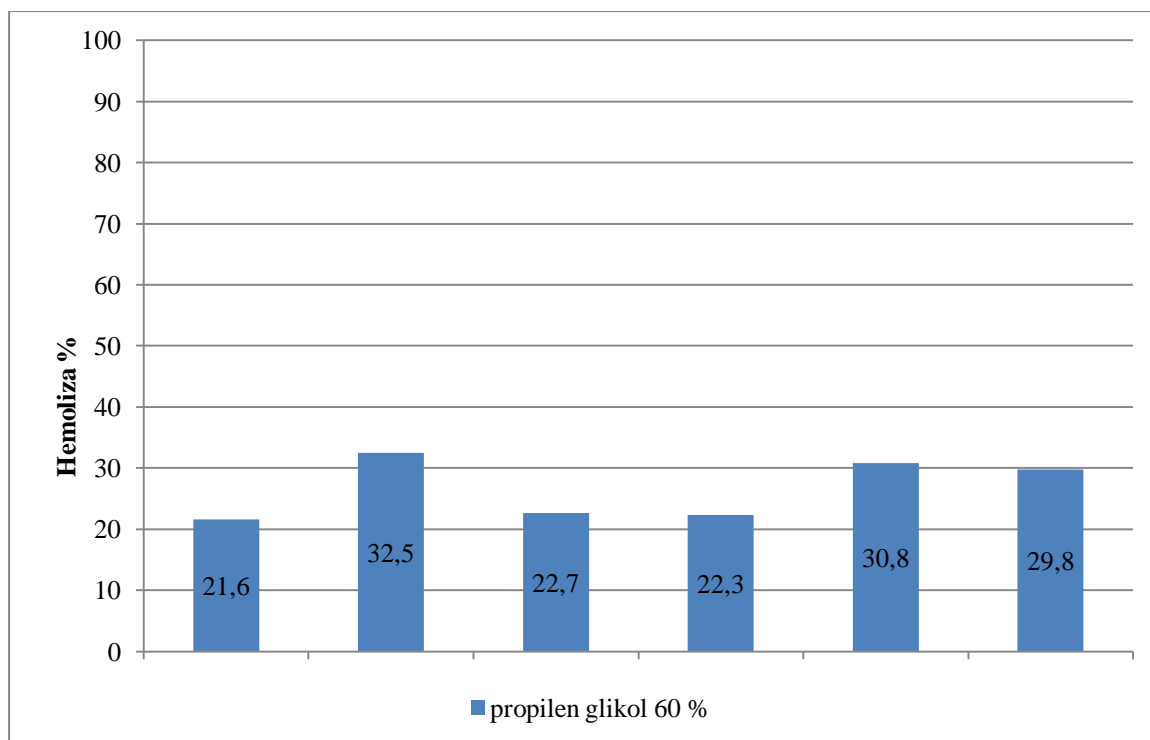
Svi testirani spojevi uzrokovali su hemolizu u testiranim dozama. 1 % saponin uzrokovao je 74 % hemolizu što je više nego postotak hemolize uzrokovan 2 % saponinom (48 %). Međutim, postoje velika odstupanja između mjerenja (Slika 5). U jednom uzorku 1 % saponin uzrokovao je 100 %-tnu hemolizu, u drugom 48 %, a trećem 74 %. Kod 2 % saponina odstupanja su puno manja. de Sena Pereira i sur. koristili su Triton-X-100 kao pozitivnu kontrolu za 100 % hemolizu, ali nije poznat omjer Tritona-X-100 i suspenzije eritrocita. U ovom radu korišten je 0,5 %, 1 % i 2 % Triton-X-100 pomiješan s krvi u omjeru 1:1 te je izazvao 36 %, 42 % i 38 % hemolizu. Triton-X-100 niti u jednom testiranom uzorku nije uzrokovao 100 % hemolizu (Slika 6). S obzirom na mali broj uzoraka, velika je vjerojatnost slučajne pogreške.



Slika 5. Hemoliza prisutna u uzorcima izazvana dodatkom saponina.



Slika 6. Hemoliza prisutna u uzorcima izazvana dodatkom triton-X-100.



Slika 7. Hemoliza prisutna u uzorcima izazvana dodatkom propilen glikola.

Propilen glikol je često korišteno otapalo u oralnim, intravenskim i topičkim farmaceutskim pripravcima. Iako se generalno smatra sigurnim, kada se koristi u velikim dozama i tijekom dužeg perioda, može doći do toksičnih učinaka. Zabilježene nuspojave uključuju toksičnost za centralni živčani sustav, hiperosmolalnost, hemolizu, srčane aritmije i laktatnu acidozu. U literaturi ne postoji podatak o najvećoj sigurnoj dozi za intravensku primjenu. Jedna studija pokazala je da serumske koncentracije propilen glikola veće od 18 mg/dL mogu biti toksične. Druga istraživanja pokazuju da je najveća vjerojatnost pojave toksičnog učinka kod serumskih koncentracija većih od 25 mg/dL (Lim i sur., 2014). Tablica 1 pokazuje neke komercijalne tvari koje se administriraju s minimalno 40 %-tnim propilen glikolom dok tablica 2 ukazuje da bi te komercijalno dostupne formulacije izazvale hemolizu. Te kontradikcije su prihvatljive jer je hemoliza kompleksan događaj na koji utječu različiti faktori. Naprimjer, hemolitički efekt se može eliminirati sporijom brzinom ubrizgavanja čime se smanjuje koncentracija ekscipijenta na mjestu injektiranja (Amin i sur., 2006). U ovom radu korišten je 60 % propilen glikol pomiješan s krvi u omjeru 1:1 te je uzrokovao 27 % hemolizu. U podacima iz literature nije poznato u kojim omjerima su miješani krvi i propilen glikol.

Stupanj hemolize određivan je na dva analizatora. Prednost automatskog čitača mikrotitarskih pločica u odnosu na spektrofotometar s kivetama je što se istovremeno može analizirati više uzoraka (96 jažica) dok se na spektrofotometru moraju analizirati jedan po jedan te zahtjeva manji volumen za analizu. Za očitavanje na mikrotitarskim pločicama dovoljan je volumen 100 μ L. Sama metoda je relativno dugotrajna jer iziskuje dosta pipetiranja, inkubaciju uzoraka 5 minuta, centrifugiranje 15 minuta i stajanje na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zbog toga nije idealna za analizu velikog broja uzoraka. Nedostatak metode s Drabkinovim reagensom je taj što zahtjeva precizno pipetiranje te je podložna interferencijama lipidima, proteinima plazme i leukocitima. Zamućenje zbog prisutnosti proteina, lipida i staničnih tvari može predstavljati problem kod spektrofotometrijskog određivanja hemoglobina. Velika dilucija (1:251) uvelike eliminira taj problem, ali mogu se pojaviti lažno povišene vrijednosti ukupnog hemoglobina kod uzoraka s velikom koncentracijom proteina plazme. Izrazito lipemični uzorci i oni s velikim brojem leukocita također mogu uzrokovati lažno povišen ukupni hemoglobin. Sam reagens je izrazito štetan za vodeni svijet, ne smije se izljevati u odvod, toksičan u dodiru s kožom i ako se udiše. U Indiji je provedeno istraživanje u bolnici u Mumbaiju gdje je uspoređena hemiglobincijanidna metoda s ne-cijanidnim metodama (alkalna hematinska metoda i metoda s alkalnim boratom). Rezultati su pokazali izvrsnu korelaciju između tri metode. Metode bez cijanida pokazale su prednosti sa stajališta sigurnosti kao i troškova (Shah VB i sur., 2011). Prednost hemiglobincijanid metode je što postoji internacionalni standard i reagens je jeftin (<https://acutecaretesting.org>).

5. ZAKLJUČAK

Iz svega navedenoga u diplomskom radu i na osnovu dobivenih rezultata, proizlaze sljedeći zaključci:

1. Određivanje stupnja hemolize eritrocita jedan je od načina koji farmaceutski znanstvenici mogu koristiti za procjenu sigurnosti i korisnosti parenteralnih pripravaka.
2. Mjerenjem apsorbancije slobodnog hemoglobina u tretiranim uzorcima i ukupnog hemoglobina u uzorcima pune krvi može se odrediti postotak hemolize na bilo kojem laboratorijskom UV-VIS spektrofotometru što ovu metodu čini praktičnom i lako primjenjivom, no postoje određena ograničenja.
3. Metoda nije pogodna za analizu velikog broja uzoraka jer je dugotrajna i zahtjeva precizno pipetiranje. UV-VIS spektrofotometar s kivetama istovremeno može mjeriti apsorbanciju samo jednog uzorka.
4. Postupak se može ubrzati primjenom automatskog čitača mikrotitarskih pločica koji omogućava istovremenu analizu više uzoraka. Druga prednosti automatskog čitača mikrotitarskih pločica je što zahtjeva manji volumen za očitavanje apsorbancije.
5. Drabkinov reagens koji se koristi u opisanim metodama je cjenovno pristupačan i za njega postoji internacionalni standard. Međutim, toksičan je i štetan za okoliš, stoga treba nastojati usavršiti i koristiti alternativne metode bez cijanida.

6. LITERATURA

Amin K, Dannenfelser RM. In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 95(6), 1173-1176.

Azman WNW, Omar J, Koon TS, Ismail TST. Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman Medical Journal*, 2019, 34(2), 94-98.

de Sena Pereira VS, de Oliviera CBS, Fumagalli F, da Silva Emery F, da Silva NB, de Andrade-Neto VF. Cytotoxicity, hemolysis an in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Toxicology Reports*, 2016, 3, 756-762.

Greco I, Molchanova N, Holmedal E, Jenssen H, Hummel BD, Watts JL, Hakansson J, Hansen PR, Svenson J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity od synthetic antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 2020, 10.

Hemoglobin and its measurement, 2005., <https://acutecaretesting.org/en/articles/hemoglobin-and-its-measurement>, pristupljeno 12.7.2021.

Hemoglobin, Iron, and Bilirubin, 2016., <https://basicmedicalkey.com/hemoglobin-iron-and-bilirubin> , pristupljeno 21.6.2021.

Honek J. Preclinical research in drug development. *Medical Writing*, 2017, 26(4).

Ionova J, Wilson L. Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. *PLOS ONE*, 2020, 15(6).

Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis on routine biochemistry parameters. *Biochemia Medica 2011*, 21(1), 79-85.

Lim TY, Poole RL, Pageler NM. Propylene Glycol Toxicity in Children. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2014, 19(4), 277-282.

Lippi G, Favaloro EJ, Franchini M. Haemolysis index for screening of intravascular haemolysis: a novel diagnostic opportunity? *Blood Transfus*, 2018, 16, 433-437.

Pramanick S, Singodia D, Chandel V. Excipient Selection In Parenteral Formulation Development. *Pharma Times*, 2013, 45(3), 65-77.

Rapido F. The potential adverse effects of haemolysis. *Blood Transfus*, 2017, 15, 218-221.

Shah VB, Shah BS, Puranik GV. Evaluation of non cyanide methods for hemoglobin estimation. *Indian Journal of Patrhology & Microbiology*, 2011, 54(4), 764-768.

7. SAŽETAK

7.1. Sažetak

In vivo (intravaskularna) hemoliza je relativno rijetko (1:10 000/100 000), ali životno ugrožavajuće stanje koje, između ostalog, može biti uzrokovano parenteralnom primjenom lijekova. Potencijalne komplikacije uključuju žuticu, hepatosplenomegaliju, tahikardiju, ishemiju miokarda, zatajenje bubrega i respiratorno zatajenje te u konačnici, multiorgansko zatajenje i smrt. Smrtnost može biti visoka, čak do 10 %. Zbog toga je važna procjena hemolitičkog potencijala lijekova tijekom pretkliničke faze ispitivanja lijekova. Cilj ovog rada bio je uspostaviti jednostavnu metodu za procjenu stupnja hemolize. Uzorci krvi tretirani su saponinom, tritonom-X-100 i propilen glikolom kako bi se izazvala hemoliza. Koncentracija hemoglobina određena je metodom s Drabkinovim reagensom te mjerena na dva tipa analizatora: spektrofotometru s kivetama (Cecil-CE 1011) i automatskom čitaču mikrotitarskih pločica (PerkinElmer-VICTOR3 1420 Multilabel Counter). Postotak hemolize izračunat je dijeljenjem apsorbancije uzoraka tretirane krvi s apsorbancijom uzoraka pune krvi. Metoda je praktična i lako primjenjiva, ali nije pogodna za analizu velikog broja uzoraka jer je dugotrajna i zahtjeva precizno pipetiranje. To se djelomično može poboljšati primjenom automatskog čitača mikrotitarskih pločica koji omogućava istovremenu analizu više uzoraka. Još jedan nedostatak je toksičnost Drabkinovog reagensa i štetnost za okoliš. Prednost opisane metode je jeftin reagens i postojanje internacionalnog standarda.

7.2. Summary

In vivo (intravascular) hemolysis is relatively rare (1:10 000/100 000), but a life-threatening condition that, among other things, can be caused by parenteral administration of drugs. Potential complications include jaundice, hepatosplenomegaly, tachycardia, myocardial ischemia, renal failure and respiratory failure, and ultimately, multiorgan failure and death. Mortality can be as high as 10 %. Therefore, it is important to assess the hemolytic potential of drugs during the preclinical phase of drug testing. The aim of this study was to establish a simple method for estimating the percentage of hemolysis. Blood samples were treated with saponin, triton-X-100, and propylene glycol to induce hemolysis. The hemoglobin concentrations were determined by the Drabkin reagent method on two types of analyzers: a spectrophotometer with cuvette (Cecil-CE 1011) and an automatic microtiter plate reader (PerkinElmer-VICTOR3 1420 multilabel Counter). The percentage of hemolysis was calculated by dividing the absorbance of treated blood samples with the absorbance of whole blood samples. The method is practical and easy to apply but, it is not suitable for analysis of a large number of samples because it is time consuming and requires precise pipetting. This can be partially improved by using automatic microtiter plate reader that allows simultaneous analysis of multiple samples. Another disadvantage is toxicity of the Drabkin reagent and harmfulness to the environment. The advantage of described method is cheap reagent and existence of the international standard.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

ADP – adenin difosfat

ATP – adenin trifosfat

EtOH – etilni alkohol

FO – fiziološka otopina

INL – ispitivani novi lijek

LADME – apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija (engl. *liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion*)

LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. *Low-density lipoprotein*)

NET – neutrofilne ekstracelularne zamke (engl. *Neutrophil extracellular traps*)

NO – dušikov oksid

PEG – polietilen glikol

PG – propilen glikol

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive oxygen species*)

SP – slijepa proba

TLR4 – engl. *Toll like receptor 4*

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UPOSTAVA POSTUPKA ZA ODREĐIVANJE STUPNJA HEMOLIZE

Nikolina Benc

SAŽETAK

In vivo (intravaskularna) hemoliza je relativno rijetko (1:10 000/100 000), ali životno ugrožavajuće stanje koje, između ostalog, može biti uzrokovano parenteralnom primjenom lijekova. Potencijalne komplikacije uključuju žuticu, hepatosplenomegaliju, tahikardiju, ishemiju miokarda, zatajenje bubrega i respiratorno zatajenje te u konačnici, multiorgansko zatajenje i smrt. Smrtnost može biti visoka, čak do 10 %. Zbog toga je važna procjena hemolitičkog potencijala lijekova tijekom pretkliničke faze ispitivanja lijekova. Cilj ovog rada bio je uspostaviti jednostavnu metodu za procjenu stupnja hemolize. Uzorci krvi tretirani su saponinom, tritonom-X-100 i propilen glikolom kako bi se izazvala hemoliza. Koncentracija hemoglobina određena je metodom s Drabkinovim reagensom te mjerena na dva tipa analizatora: spektrofotometru s kivetama (Cecil-CE 1011) i automatskom čitaču mikrotitarskih pločica (PerkinElmer-VICTOR3 1420 Multilabel Counter). Postotak hemolize izračunat je dijeljenjem apsorbancije uzoraka tretirane krvi s apsorbancijom uzoraka pune krvi. Metoda je praktična i lako primjenjiva, ali nije pogodna za analizu velikog broja uzoraka jer je dugotrajna i zahtjeva precizno pipetiranje. To se djelomično može poboljšati primjenom automatskog čitača mikrotitarskih pločica koji omogućava istovremenu analizu više uzoraka. Još jedan nedostatak je toksičnost Drabkinovog reagensa i štetnost za okoliš. Prednost metode je jeftin reagens i postojanje internacionalnog standarda.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 7 grafičkih prikaza, 8 tablica i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hemoliza, stupanj hemolize, formulacije lijekova, ekscipijenti, ispitivanja lijekova

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Donatella Verbanac, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Monika Barbarić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ESTABLISHING A PROCEDURE FOR DETERMINING THE DEGREE OF HEMOLYSIS

Nikolina Benc

SUMMARY

In vivo (intravascular) hemolysis is relatively rare (1:10 000/100 000) but a life-threatening condition that, among other things, can be caused by parenteral administration of drugs. Potential complications include jaundice, hepatosplenomegaly, tachycardia, myocardial ischemia, renal failure and respiratory failure, and ultimately, multiorgan failure and death. Mortality can be as high as 10 %. Therefore, it is important to assess the hemolytic potential of drugs during the preclinical phase of drug testing. The aim of this study was to establish a simple method for estimating the percentage of hemolysis. Blood samples were treated with saponin, triton-X-100 and propylene glycol to induce hemolysis. The hemoglobin concentrations were determined by the Drabkin reagent method on two types of analyzers: a spectrophotometer with cuvette (Cecil-CE 1011) and an automatic microtiter plate reader (PerkinElmer-VICTOR3 1420 multilabel Counter). The percentage of hemolysis was calculated by dividing the absorbance of treated blood samples with the absorbance of whole blood samples. The method is practical and easy to apply, but it is not suitable for analysis of a large number of samples because it is time consuming and requires precise pipetting. This can be partially improved by using automatic microtiter plate reader that allows simultaneous analysis of multiple samples. Another disadvantage is toxicity of the Drabkin reagent and harmfulness to the environment. The advantage of the method is cheap reagent and existence of the international standard.

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

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 8 tables and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hemolysis, hemolysis percent, drug formulations, excipients, drug trials

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Donatella Verbanac, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Monika Barbarić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2021.