

(21)

Czy przenikalność leku jest uwarunkowana zawartością środka konserwującego? Analiza *in vitro* na modelu komórkowym nabłonka ludzkiej rogówki przenikalności trzech preparatów okulistycznych zawierających latanoprost

Does preservative content affect drug permeability? The permeability analysis in vitro of 3 ophthalmic Latanoprost formulations in a human epithelial cell culture model

Dorota Romaniuk¹, Jan Smagur², Agnieszka Cisek², Justyna Antonik², Wanda Romaniuk¹

¹ Specjalistyczny Gabinet Okulistyczny w Katowicach

² Selvita S.A. w Krakowie

Abstrakt:

Cel: porównawcze określenie przenikalności poszczególnych preparatów latanoprostu (Xaloptic – Polpharma SA, Xalatan – Pfizer Europe MA EEIG, Monoprost – Thea Pharma S.A.) przez wyhodowane *in vitro* komórki nabłonka ludzkiej rogówki otrzymane z linii komórkowej HCE-T.

Material i metody: przenikalność dla wszystkich 3 preparatów była mierzona w warunkach określonych dla latanoprostu API (substancji czynnej farmakologicznie). Analizę statystyczną przenikalności oraz ilości preparatu pozostającego po przejściu przez błonę komórkową wykonano za pomocą testu ANOVA i testu wielokrotnych porównań Tukeya (GraphPad Prism 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA).

Wyniki: wykazano istnienie różnic w przenikalności badanych preparatów: dla preparatów Xaloptic i Xalatan wynosiła ona odpowiednio: $5,49 \pm 1,64 \times 10^{-6}$ cm/sek i $4,66 \pm 1,13 \times 10^{-6}$ cm/sek. Najlepszą przenikalnością przez komórki nabłonka rogówki ($23,70 \pm 1,71 \times 10^{-6}$ cm/s) oraz największym wskaźnikiem konwersji ($28,13 \pm 5,85\%$) charakteryzował się Xaloptic. Różnice między Xalatanem a Xaloptikiem były niewielkie, lecz znamienne statystycznie ($21,21 \pm 1,29 \times 10^{-6}$ cm/s oraz $18,41 \pm 2,96\%$). Najniższymi wskaźnikami przenikalności ($0,39 \pm 0,07 \times 10^{-6}$ cm/s) i konwersji ($0,34 \pm 0,16\%$) charakteryzował się Monoprost. Wnioski: Różnice we wskaźnikach przenikalności i biodostępności poszczególnych preparatów mogą być spowodowane ich odmiennym składem, a także obecnością środka konserwującego lub jego brakiem.

Słowa kluczowe:

przenikalność leku, latanoprost, BAK, komórki nabłonka ludzkiej rogówki.

Abstract:

Aim: Comparative permeability analysis of the 3 following Latanoprost formulations intended for ophthalmic use: Xaloptic (Polpharma S.A.), Xalatan (Pfizer Europe MA EEIG) and Monoprost (Thea Pharma S.A.) across human corneal epithelium (HCE-T culture model) *in vitro*.

Material and methods: Permeability analysis was performed under conditions suitable for latanoprost API (active pharmaceutical ingredient). Statistical analysis of permeability and drug quantity after passing across a cellular membrane was performed using ANOVA test and Tukey's multiple comparison test (GraphPad Prism 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA).

Results: The following differences in permeability were noted between the analyzed drugs: The permeability rates for Xaloptic and Xalatan were $5.49 \pm 1.64 \times 10^{-6}$ cm/s and $4.66 \pm 1.13 \times 10^{-6}$ cm/s, respectively. Xaloptic showed the highest permeability through human corneal epithelium ($23.70 \pm 1.71 \times 10^{-6}$ cm/s) and the highest conversion rate ($28.13 \pm 5.85\%$). As compared to Xaloptic, Xalatan slight, yet statistically significant differences with the permeability rate of $21.21 \pm 1.29 \times 10^{-6}$ cm/s and a conversion rate of $18.41 \pm 2.96\%$. Monoprost demonstrated the lowest permeability ($0.39 \pm 0.07 \times 10^{-6}$ cm/s) and the lowest conversion rate ($0.34 \pm 0.16\%$).

Conclusion: The differences in permeability and bioavailability between the 3 ophthalmic latanoprost formulations are attributable to the differences in their composition. They are also related to the content of preservative in each preparation.

Key words:

drug permeability, latanoprost, BAK, human corneal epithelial cells.

Wstęp

Obecnie w leczeniu jaskry stosuje się wiele miejscowo podawanych leków, z kilku grup, o odpowiednio różnym działaniu. Mają one na celu obniżanie ciśnienia wewnątrzgałkowego (Intraocular Pressure – IOP) i zapobieganie rozwojowi neuropatii jaskrowej. Analogi prostaglandyn i prostamidy są preparatami najczęściej stosowanymi w leczeniu jaskry pierwotnej otwartego kąta (JPOK) oraz nadciśnienia ocznego, również jako leczenie pierwszego rzutu. Zwiększają one odpływ cieczy wodnistej drogą naczyniówkowo-twardówkową. Zaleca się, aby analogi prostaglandyn były stosowane tylko 1 raz dziennie, w przeciwieństwie do leków z innych grup, ponieważ takie dawkowanie nie stwarza zbyt dużego obciążenia dla pacjenta i umożliwia regularne podawanie leku.

Obecnie w leczeniu jaskry są stosowane cztery substancje: latanoprost, trawoprost, tafluprost oraz bimatoprost. Tafluprost (Taflotan, Santen) oraz latanoprost (Monoprost, Thea, Clermont-Ferrand) są preparatami niezawierającymi chlorku benzalkonium (BAK). Analogi prostaglandyn charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie, dlatego w ich składzie znajdują się rozpuszczalniki takie jak MHGS40 (hydroksystearynian makroglicerolu) lub Polisorbat 80 (1, 2). Niekiedy środek konserwujący zawarty w leku może wywołać efekty uboczne takie jak: zadrażnienie oczu, nadmierne łzawienie, poczucie ciała obcego, świąd i zaczerwienienie skóry w okolicy oczu. To powoduje, że pacjent zaprzestaje stosowania leku, a w konsekwencji dochodzi do rozwoju uszkodzenia jaskrowego.

Latanoprost jest selektywnym agonistą receptora prostanoidowego FP (analogiem prostaglandyny F_{2α}) obniżającym IOP w wyniku zwiększenia odpływu cieczy wodnistej drogą naczyniówkowo-twardówkową. Absorbują go komórki nabłonka rogówki, w których prolek – ester izopropylu – jest hydrolizowany przez esterazy do biologicznie aktywnej formy kwasu.

Środkiem konserwującym najczęściej stosowanym w preparatach przeciwjaskrowych jest chlorek benzalkonium (BAK) – nietoksyczny i dobrze rozpuszczalny w wodzie czwartorzędowy związek amoniowy. Zmniejsza on napięcie powierzchniowe w roztworach wodnych. Zwiększa przepuszczalność nabłonka rogówki dla substancji hydrofilnych oraz zmniejsza ekspresję okludyny – białka odpowiedzialnego za ścisłe połączenia (ang. tight junctions) między komórkami nabłonka rogówki. Dodatkowo oddziałuje bakteriobójczo zarówno na organizmy Gram (+), jak i Gram (-). Stężenia BAK w preparatach okulistycznych przeważnie są 0,01- i 0,02-procentowe, rzadko zatem znacząco bezpośrednio oddziałują toksycznie na komórki śródbłonka rogówki (3).

Cel

Celem pracy jest analiza porównawcza na wyhodowanym *in vitro* modelu komórkowym wskaźników przenikalności przez nabłonek ludzkiej rogówki trzech preparatów okulistycznych, które zawierają latanoprost, zarówno z BAK, jak i bez niego.

Materiał i metody

Badanie wykonano w Laboratorium Selvita. Wykorzystano w nim linię komórkową HCE-T (human corneal epithelial cells, RIKEN – Bio Resource Center, RCB2280) nabłonka ludzkiej rogówki uzyskanego od zdrowego 47-letniego dawcy za pomocą wektora – rekombinowanego adenowirusa SV40.

Hodowla linii komórkowej była prowadzona zgodnie z zasadami GLP (Good Laboratory Practice) w ściśle określonych warunkach (Standaryzacja SOP-01): objętość 25 cm³ lub 75 cm³ w temperaturze 37°C, podłoże zawierające 5% CO₂, HAM F12, 5% FBS, 10 ng/mL hEGF (human epidermal growth factor – ludzki naskórkowy czynnik wzrostu), 10 μg/mL rekombinowanej insuliny ludzkiej, 0,5% DMSO, 2 mM L-glutaminianu oraz antybiotyki (penicylina i streptomycyna). Regularnie przeprowadzano testy na obecność infekcji *Mycoplasma*.

Komórki nabłonka rogówki charakteryzują się szybkim namnażaniem – już po 24 godzinach ich liczba zostaje podwojona; w hodowli na granicy powietrze–płyn zachowują wszelkie cechy zdrowego wielowarstwowego nabłonka ludzkiej rogówki. Ciasna bariera komórkowa umożliwia rozróżnienie substancji hydrofilnych od lipofilnych (4). Linia komórkowa HCT-1 znajduje zastosowanie w badaniu przenikalności i biodostępności rogówki oraz toksyczności miejscowo stosowanych leków.

Analizą porównawczą objęto cztery substancje:

- Latanoprost API (cGMP), Yonsung Fine Chemical CO, Ltd;
- Xaloptic 0,005% – 0,05 mg/mL (Polpharma S.A.);
- Xalatan 0,005% – 0,05 mg/mL (Pfizer Europe MA EEIG);
- Monoprost 0,005% – 0,05 mg/mL (Thea Pharma S.A.).

Materiałem referencyjnym był chlorowodorek betaksololu CRS (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care – EDQM). Xaloptic vehiculum pełnił rolę *placebo* (Polpharma S.A.)

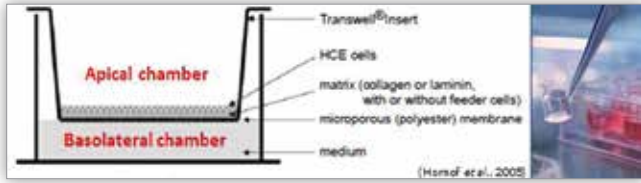
Konstrukcja modelu komórek nabłonka ludzkiej rogówki *in vitro* przebiegała następująco:

1. membranę MiliCell pokryto kolagenem szczurzym typu 1. (roztwór kolagenu o stężeniu 1,3 mg/mL w ilości 300 μL w każdej hodowli), następnie hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny;
2. po inkubacji usunięto pozostały roztwór kolagenu, a każdą z hodowli dwukrotnie przepłukano roztworem 400 μL DMEM 4,5 g/L (Lonza)/ HAM F12 (Lonza) w stosunku 1: 1;
3. komórki HCE-T wysiewano (gęstość 1 × 10⁵/cm²) na 400 μL podłoża hodowlanego, hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ oraz 95% wilgotności.
4. integralność pojedynczej warstwy komórek oceniano poprzez pomiar przezbłonowej oporności elektrycznej (Transepithelial Electrical Resistance – TEER) w 2–3 dniowych odstępach, po każdym pomiarze wymieniano podłoże hodowlane;
5. po osiągnięciu wartości TEER powyżej 200Ω/cm² po około 5–7 dniach usuwano podłoże hodowlane, a komórki umieszczano na granicy powietrze–płyn.
6. hodowlę prowadzono przez 7 dni w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ oraz 95% wilgotności – mierzono TEER i wymieniano podłoże 3 razy w tygodniu.

Po określonym czasie inkubację zakończono i określono wartość TEER dla każdej próbki. W celu odbiałczenia hodowli komórkowej i usunięcia z niej resztek podłoża odżywczego model 2-krotnie przepłukano sterylnym roztworem, następnie materiał przeniesiono na 24-komorową płytkę odbiorczą służącą do analizy.

Aby ocenić wskaźnik transportu komórek z warstwy apikalnej do bazalnej, w odpowiednich komorach filtrujących umieszczano 400 μL roztworu latanoprostu API, badane preparaty oraz *placebo* (Xaloptic vehiculum) (ryc. 1.). Komory płytki odbiorczej były wypełnione 800 μL buforu DPBS. Jako kontrolę stosowano analizę transportu betaksololu w roztworze BSS/10 mM Hepes.

Kolejna inkubacja z wirowaniem (100 obrotów/min) w temperaturze 34°C trwała 4 godziny (punkty pomiaru po 30 min i w każdej kolejnej godzinie), po jej zakończeniu do analizy pobierano takie same objętości badanych substancji. Analityczna część pracy została wykonana zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej. Po zakończeniu inkubacji ponownie określano wartości TEER.



Ryc. 1. Transport komórek z komory apikalnej do komory bazalnej – hodowla komórek linii HCE-T.

Fig. 1. Cellular transport from apical chamber to basolateral chamber – HCE-T cell line culture.

Za pomocą pomiaru przezblonowej oporności elektrycznej ocenia się szczelność bariery komórkowej (opór), kiedy badana substancja przechodzi przez ciasne połączenia komórkowe. Pojęciem balans masy (Mass Balance – MB) określa się odsetek badanej substancji pozostały po jej przejściu przez barierę komórkową po inkubacji – jest on związany z przenikalnością substancji w modelu komórkowym oraz szybkością jej transportu.

Przenikalność (Permeability Appearance – P_{app}) to ilość substancji przenikająca przez barierę biologiczną. Analizę statystyczną przeprowadzono dla przenikalności latanoprostu w postaci API (Active Pharmacological Ingredient – $P_{app L}$), kwasu latanoprostowego ($P_{app LFA}$) oraz sumy latanoprostu i kwasu ($P_{app L+LFA}$). Latanoprost, podawany w formie proleku, w komórkach nabłonka rogówki pod wpływem enzymów – esteraz – ulega przekształceniu do formy aktywnej (kwas latanoprostowy). Latanoprost przenika przez nabłonek rogówki zarówno w formie API, jak i kwasu.

Po wytworzeniu *in vitro* linii hodowlanej komórek nabłonka ludzkiej rogówki sprawdzano integralność warstwy komórkowej poprzez kilkukrotne pomiary TEER. Wartość graniczna powyżej 300 Ω/cm^2 świadczy o wytworzeniu jednolitej struktury błony komórkowej; mierzone wartości są wynikiem specyficznego transportu przez warstwę komórek. Wartości takie uzyskano po 5–7 dniach hodowli. Za pomocą kolejnego pomiaru oporności przezblonowej oceniano wskaźnik transportu substancji dla poszczególnych preparatów po inkubacji.

Do analizy statystycznej oraz określenia procentu konwersji latanoprostu do aktywnego farmakologicznie metabolitu wykorzystano test ANOVA oraz test wielokrotnych porównań Tukeya.

Wyniki

Wstępne wyniki pomiarów kwaśnej formy latanoprostu w komorze odbiorczej wykazały bardzo słabą jego przenikalność. Latanoprost w formie estru nie przechodził przez komórki nabłonka rogówki i tylko około 20% ulegało transformacji do formy kwaśnej, a około 60% substancji odzyskano po inkubacji. Dokonano optymalizacji warunków hodowlanych, aby zwiększyć aktywność esteraz.

Właściwego eksperymentu dokonywano w temperaturze 34°C – fizjologicznej temperaturze rogówki ludzkiej. Obniżenie temperatury wpłynęło znacząco na polepszenie przenikalności latanoprostu w formie kwaśnej przez komórki nabłonka. Zaob-

serwowano także zależne od temperatury wzmoczenie aktywności esteraz nabłonkowych. Odnotowano około 50-procentową konwersję latanoprostu do formy kwaśnej w temperaturze 34°C, forma kwaśna była obecna zarówno w komorze apikalnej, jak i w komorze bazalnej (odbiorczej). Zmiana temperatury natomiast nie wpłynęła na polepszenie przenikalności latanoprostu przez komórki nabłonka w formie estru (proleku).

Przenikalność betaksololu (selektywnego blokera receptorów β_1 użytego jako substancja kontrolna) wzrosła nieznacznie po inkubacji w temperaturze 34°C, w porównaniu z temperaturą pokojową (odpowiednio: $P_{app} = 20,17 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ i $P_{app} = 16,01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$). Wykazano także, że latanoprost nie wiąże się z polistyrenem (komora odbiorcza) ani błoną poliwęglanową, a to wraz z małymi wartościami MB (około 0,6) wskazuje na jego akumulację w komórkach linii HCE-T. Pomiary stopnia przenikalności w temperaturze 34°C w czasie do 4 godzin pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników – dotyczących formy kwaśnej – zgodnych z danymi z literatury medycznej ($P_{app LFA} = 18,14 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ – linia komórkowa HCE-T, i $P_{app LFA} = 18,5 \pm 2,3 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ – linia komórek nabłonka rogówki Clonetics). Podobne wyniki uzyskano w badaniu na króliczym modelu komórek nabłonka rogówki.

Analiza przenikalności preparatów okulistycznych (Xalopicu, Xalatanu i Monoprostu) była wykonywana w warunkach określonych dla latanoprostu API (substancji farmakologicznie aktywnej): inkubacja do 4 godzin w temperaturze 34°C, wirowanie 100 obrotów/min. Funkcjonalność i powtarzalność modelu linii komórkowej HCE-T była za każdym razem weryfikowana za pomocą analizy przenikalności betaksololu.

W odniesieniu do poszczególnych preparatów okulistycznych wykonano zarówno badania roztworu substancji czynnej latanoprostu 50 $\mu\text{g/ml}$, jak i leków w postaciach nierozcieńczonych. Współczynniki przenikania wszystkich substancji były obliczane jako liniowy wzrost krzywej przenikalności pomnożony przez stałą wartość zależną od parametrów modelu rogówki oraz początkowe wartości stężenia analizowanej substancji. Wartości przenikalności i procent konwersji proleku – estru latanoprostu – do farmakologicznie aktywnej formy kwaśnej (Latanoprost Free Acid – $P_{app-LFA}$), a także wartości stężenia latanoprostu w komorze bazalnej określano w odniesieniu do wszystkich badanych preparatów.

Wartości analizy w odniesieniu do poszczególnych preparatów przedstawiono w tabelach I–IV.

Latanoprost przenika do rogówki, w niej ulega szybkiej i całkowitej hydrolizie do bardziej hydrofilnego kwasu latanoprostowego. W linii komórkowej HCE-T ekspresja enzymów metabolizujących była podobna do tej, którą uzyskano w komórkach nabłonka ludzkiej rogówki. Pomimo potwierdzonej aktywności esterazy w komórkach HCE-T latanoprost w warunkach eksperymentu nie był całkowicie konwertowany do formy kwaśnej. Dzięki silnym właściwościom lipofilnym estru latanoprostu (proleku) może on łatwo przenikać przez podwójną warstwę lipidową błony komórkowej nabłonka rogówki. Niezależnie od lipofilności leku każda zmiana w jego składzie wpływa na stopień intensywności przenikania przez rogówkę, a w konsekwencji na absorpcję w gałce ocznej. Kationowy surfaktant, BAK, wzmacnia przenikanie leków przez rogówkę poprzez emulsyfikację i przerwanie nabłonka rogówki. W znacznym stopniu zwiększa też przenikalność składników hydrofilnych, lecz jego wpływ na przenikalność składników lipofilnych jest ograniczony (5). W opisywanym badaniu w preparatach zawierających

Xaloptic® 0,05%, Polpharma S.A.							
Exp./Rep	TEER ± SD [Ωcm ²] Pre-Exp.	TEER ± SD [Ωcm ²] Post-Exp.	P _{app LFA} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → LFA	P _{app L} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → L	P _{app LFA+L} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → L + LFA	Conversion* L → LFA [%]	MB
1/1	342 ± 10	33 ± 17	3,75	18,51	22,26	20,90	0,37
1/2	357 ± 13	23 ± 14	3,47	19,15	22,63	20,94	0,39
2/1	330 ± 36	7 ± 15	7,54	19,15	26,70	31,77	0,41
2/2	245 ± 16	18 ± 10	6,54	16,59	23,13	32,92	0,42
3/1	418 ± 34	37 ± 17	5,17	17,55	22,72	33,62	0,40
3/2	405 ± 14	28 ± 17	6,45	18,33	24,78	28,62	0,44
Mean ± SD	350 ± 62	24 ± 11	5,49 ± 1,64	18,22 ± 0,99	23,70 ± 1,71	28,13 ± 5,84	0,41 ± 0,02

Tab. I. Wyniki pomiarów przepuszczalności preparatu Xaloptic przez komórki nabłonka rogówki.
TEER ± SD mierzono przed każdym doświadczeniem i po nim, współczynniki przenikania obliczono na podstawie wolnej kwaśnej formy latanoprostu (P_{app LFA}), latanoprostu (P_{app L}) oraz obu, nieaktywnej postaci leku (API) i postaci aktywnej (P_{app LFA+L}); procent konwersji latanoprostu do wolnej formy kwaśnej oraz balans masy (MB).
TEER – oporność przez błonową, SD – odchylenie standardowe, L – latanoprost, LFA – wolny kwas latanoprostowy;
* – procent konwersji latanoprostu do formy kwaśnej jest określony po 4-godzinnej inkubacji

Tab. I. Xaloptic® (Polpharma S.A.) permeability through the HCE-T model.
TEER ± SD was measured before and after each experiment, permeation coefficients were calculated based on latanoprost free acid (P_{app LFA}), latanoprost (P_{app L}), both inactive (API) and active drug forms (P_{app LFA+L}), % of latanoprost conversion to free acid form, and mass balance (MB).
TEER – transepithelial electrical resistance, SD – standard deviation, L – Latanoprost,
LFA – Latanoprost free acid
* Conversion (%) of latanoprost to free acid form was calculated for the 4 h incubation time-point

Xalatan® 50 µg/mL, Pfizer Europe MA EEIG							
Exp./Rep	TEER ± SD [Ωcm ²] Pre-Exp.	TEER ± SD [Ωcm ²] Post-Exp.	P _{app LFA} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → LFA	P _{app L} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → L	P _{app LFA+L} [× 10 ⁻⁶ cm/s] L → L + LFA	Conversion* L → LFA [%]	MB
1/1	349 ± 8	30 ± 23	3,38	17,46	20,85	14,29	0,46
1/2	280 ± 23	19 ± 16	3,66	17,65	21,35	15,29	0,44
2/1	380 ± 12	40 ± 34	6,08	16,59	22,67	21,11	0,49
2/2	319 ± 25	21 ± 34	5,81	16,05	21,85	20,70	0,50
3/1	465 ± 25	38 ± 16	4,94	16,73	21,67	20,56	0,45
3/2	417 ± 23	35 ± 20	4,11	14,77	18,88	18,52	0,41
Mean ± SD	368 ± 67	31 ± 9	4,66 ± 1,13	16,54 ± 1,05	21,21 ± 1,29	18,41 ± 2,96	0,46 ± 0,03

Tab. II. Wyniki pomiarów przepuszczalności preparatu Xalatan przez komórki nabłonka rogówki.
TEER ± SD mierzono przed każdym doświadczeniem i po nim, współczynniki przenikania obliczono na podstawie wolnej kwaśnej formy latanoprostu (P_{app LFA}), latanoprostu (P_{app L}) oraz obu, nieaktywnej postaci leku (API) i postaci aktywnej (P_{app LFA+L}); procent konwersji latanoprostu do wolnej formy kwaśnej oraz balans masy (MB).
TEER – oporność przez błonową, SD – odchylenie standardowe, L – latanoprost, LFA – wolny kwas latanoprostowy;
* – procent konwersji latanoprostu do formy kwaśnej jest określony po 4-godzinnej inkubacji

Tab. II. Xalatan® (Pfizer Europe MA EEIG) permeability through HCE-T model.
TEER ± SD was measured before and after each experiment, permeation coefficients were calculated based on latanoprost free acid (P_{app LFA}), latanoprost (P_{app L}), both inactive (API) and active drug forms (P_{app LFA+L}), % of latanoprost conversion to free acid form, and mass balance (MB).
TEER – transepithelial electrical resistance, SD – standard deviation, L – Latanoprost,
LFA – Latanoprost free acid
* Conversion (%) of latanoprost to free acid form was calculated for the 4 h incubation time-point

BAK (Xaloptic i Xalatan) zaobserwowano 3-krotnie słabszą przenikalność Papp LFA w porównaniu do przenikalności latanoprostu API. Jednocześnie nie zauważono, aby w tych dwóch preparatach BAK wpływał na wartość Papp L. Zmiany w wartości Papp LFA sugerują, że BAK wpływa na aktywność esteraz rogówkowych w modelu linii komórkowej HCE-T.

Właściwości bariery komórkowej w hodowanej linii HCE-T oceniano poprzez pomiary przez błonowego oporu elektrycznego. W preparatach zawierających 0,02-procentowy BAK (Xaloptic i Xalatan) odnotowano znaczne (około 90%) obniżenie wartości TEER w komórkach HCE-T w porównaniu do wartości sprzed

przejścia leku; latanoprost API i preparat Monoprost bez konserwantu spowodowały około 40-procentowe zmniejszenie oporu przez błonowego po 4 godzinach od inkubacji. Niewielkie wartości balansu masy w przypadku Xalopticu, Xalatanu i latanoprostu API można wytłumaczyć gromadzeniem się latanoprostu w komórkach HCE-T. Znacznie większe wartości balansu masy w przypadku Monoprostu wynikają z jego niewielkiej biodostępności i ograniczonego przenikania przez komórki nabłonka rogówki.

Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA ukazała znaczne różnice w przenikalności rogówkowej badanych produktów (P_{app LFA} i P_{app LFA+L}), a także różnice w ilości leku konwer-

Monoprost® 50 µg/mL, THEA Pharma S.A.							
Exp./Rep	TEER ± SD [Ωcm ²] Pre-Exp.	TEER ± SD [Ωcm ²] Post-Exp.	P _{app LFA} [×10 ⁻⁶ cm/s] L→LFA	P _{app L} [×10 ⁻⁶ cm/s] L→L	P _{app LFA+L} [×10 ⁻⁶ cm/s] L→L+LFA	Conversion* L→LFA [%]	MB
1/1	347 ± 14	165 ± 72	0,37	nd	0,37	0,55	0,91
1/2	355 ± 16	144 ± 31	0,32	nd	0,32	0,46	0,95
2/1	401 ± 10	146 ± 45	0,46	nd	0,46	0,26	0,89
2/2	350 ± 31	105 ± 16	nd	nd	nd	nd	nd
3/1	399 ± 36	160 ± 26	0,46	nd	0,46	0,28	0,83
3/2	404 ± 42	156 ± 36	0,32	nd	0,32	0,17	0,85
Mean ± SD	376 ± 28	146 ± 21	0,39 ± 0,07	nd	0,39 ± 0,07	0,34 ± 0,16	0,89 ± 0,05

Tab. III. Wyniki pomiarów przepuszczalności preparatu Monoprost przez komórki nabłonka rogówki.

TEER ± SD mierzono przed każdym doświadczeniem i po nim, współczynniki przenikania obliczono na podstawie wolnej kwaśnej formy latanoprostu (P_{app LFA}), latanoprostu (P_{app L}) oraz obu, nieaktywnej postaci leku (API) i postaci aktywnej (P_{app LFA+L}); procent konwersji latanoprostu do wolnej kwaśnej formy oraz balans masy (MB).

TEER – oporność przeźroczysta, SD – odchylenie standardowe, L – latanoprost, LFA – wolny kwas latanoprostowy;

* – procent konwersji latanoprostu do formy kwaśnej określony jest po 4-godzinnej inkubacji

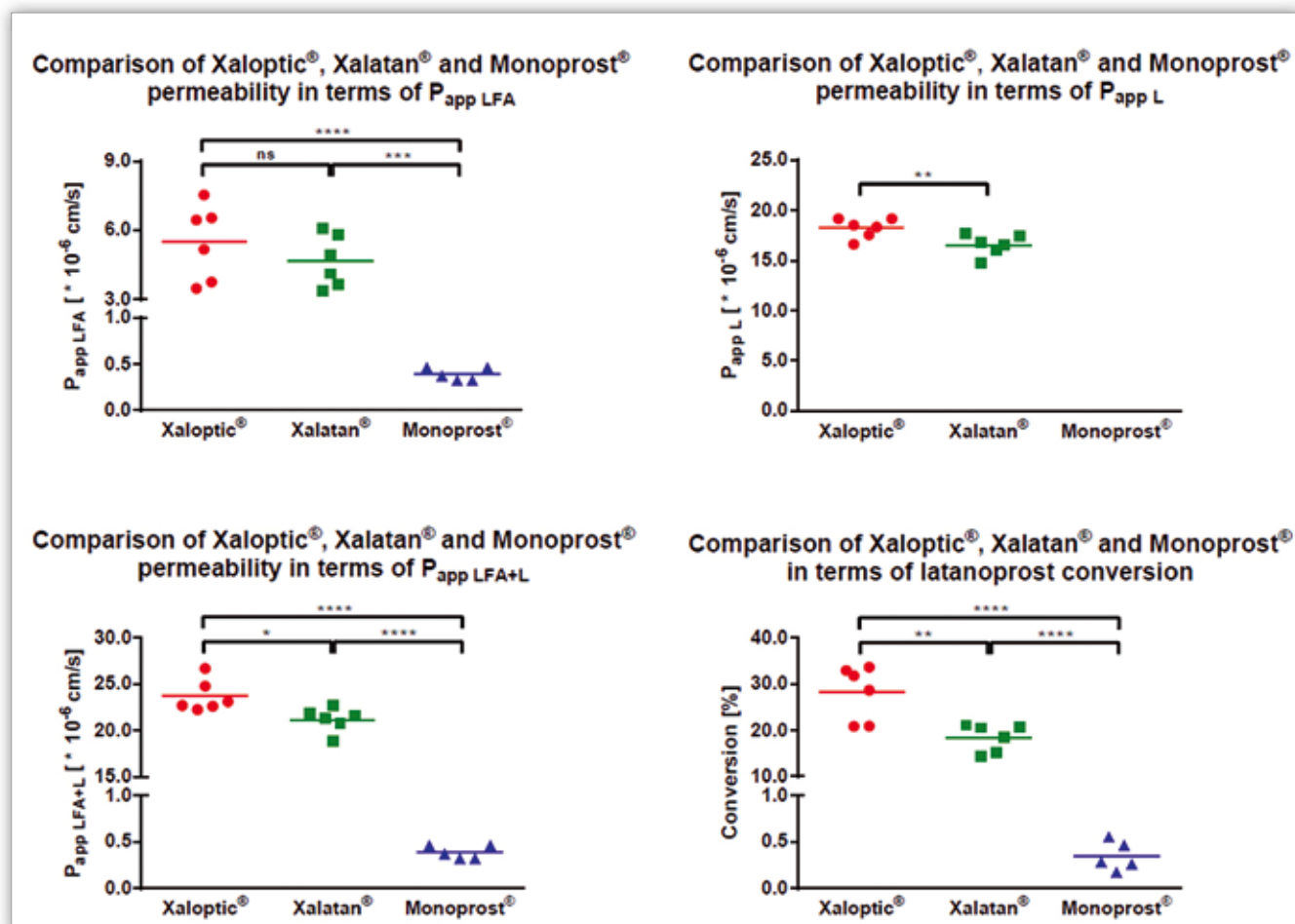
Tab. III. Monoprost® (Thea Pharma S.A.) permeability through HCE-T model.

TEER ± SD was measured before and after each experiment, permeation coefficients were calculated based on latanoprost free acid (P_{app LFA}), latanoprost (P_{app L}), both inactive (API) and active drug forms (P_{app LFA+L}), % of latanoprost conversion to free acid form, and mass balance (MB).

TEER – transepithelial electrical resistance, SD – standard deviation, L – Latanoprost,

LFA – Latanoprost free acid

* Conversion (%) of latanoprost to free acid form was calculated for the 4 h incubation time-point



Tab. IV. Porównawcze zestawienie przepuszczalności przez nabłonek rogówki poszczególnych preparatów: latanoprostu w formie kwaśnej (P_{app LFA}), latanoprostu (P_{app L}), sumy form aktywnej i nieaktywnej (P_{app LFA+L}) oraz procent konwersji latanoprostu z proleku do formy farmakologicznie aktywnej.

Tab. IV. Permeability of Xaloptic, Xalatan and Monoprost through human corneal epithelium. Comparison of P_{app LFA}, P_{app L}, P_{app LFA+L} and latanoprost conversion rates from prodrug into a pharmacologically active form.

towanego do postaci aktywnej (tab. I–IV). Analiza statystyczna za pomocą testu ANOVA ukazała znaczne różnice w przenikalności rogówkowej badanych produktów ($P_{app\ LFA}$ i $P_{app\ LFA+L}$), a także różnice w ilości leku konwertowanego do postaci aktywnej.

Analiza wielokrotnych porównań Tukeya nie wykazała znamiennych statystycznie różnic między preparatami Xaloptic i Xalatan w wartościach $P_{app\ LFA}$. Oba preparaty penetrowały wyhodowane komórki nabłonka rogówki w postaci wolnego kwasu latanoprostowego. Podczas porównania każdej pary badanych substancji statystycznie znamienne różnice ($P < 0,05$) dostrzeżono w wartościach $P_{app\ LFA+L}$ oraz konwersji do postaci farmakologicznie czynnej. Xaloptic bardziej skutecznie przenikał przez komórki nabłonka rogówki niż Xalatan i Monoprost (odpowiednio $P = 0,0120$ i $P < 0,0001$). Ponadto Xaloptic wykazywał największy procent konwersji latanoprostu do formy kwaśnej (porównanie Xaloptic – Xalatan: $P = 0,0020$; porównanie Xaloptic – Monoprost: $P < 0,0001$). Porównując wielkość $P_{app\ LFA+L}$ oraz konwersji, Xalatan wykazywał niewielką, ale statystycznie istotną wyższość nad preparatem Xaloptic. Najmniejszymi wartościami przenikalności charakteryzował się Monoprost niezawierający środka konserwującego.

Podsumowanie/ Wnioski

W przeważającej liczbie dostępnych na rynku medycznym leków okulistycznych są zawarte środki konserwujące lub substancje buforujące takie jak EDTA (wersenian disodowy) (7). Ich działanie to przede wszystkim zapobieganie zanieczyszczeniom, stosowane przez dłuższy czas jednak oddziałują toksycznie na powierzchnię gałki ocznej. Wielu autorów (6–8) podejmowało temat obecności środków konserwujących w lekach okulistycznych, zwłaszcza w preparatach obniżających ciśnienie wewnątrzgałkowe, oraz ich toksycznego oddziaływania na komórki spojówki i rogówki oka. Brignole-Baudouin i wsp. (6) ocenili profil toksykologiczny dwóch preparatów prostaglandyn stosowanych w leczeniu jaskry: trawoprostu i latanoprostu zawierających polyquad (PQ) w stężeniu 0,001% oraz BAK w stężeniach 0,015% i 0,02%. Wykazano, że mniejszą toksycznością w stosunku do nabłonka spojówki na modelu *in vitro* charakteryzowały się preparaty, w których środkiem konserwującym był polyquad.

Epstein i wsp. (7) porównali cytotoksyczność kilku rodzajów substancji konserwujących w różnych stężeniach w stosunku do wyhodowanych komórek nabłonka spojówki i rogówki oka. Tymi substancjami były: BAK, paraben metylu (MP), perboran sodu (SP), chlorobutanol (Cbl) oraz Thimerosal (Thi). Każdy ze środków konserwujących wykazywał toksyczność w stosunku do badanych komórek: BAK – od 56% do 89%, Cbl – od 50% do 86%, MP – od 30% do 76%, SP – od 23% do 59%, a Thi – od 70% do 95%. Toksyczność EDTA oraz SP była najmniejsza (od 6% do 59%) i porównywalna. Można to przedstawić schematycznie: Thi (0,0025%) > BAK (0,025%) > Cbl (0,25%) > MP (0,01%) > SP (0,0025%) ≈ EDTA (0,01%) (7).

Ammar i wsp. (8) przebadali porównawczo na modelu *in vitro* linii komórkowych nabłonka spojówki i rogówki ludzkiej działanie dwóch rodzajów środków konserwujących w preparatach przeciwjaskrowych zawierających latanoprost i timolol oraz trawoprost i timolol. Badane konserwanty to BAK w stężeniach od 0,001% do 0,05% oraz Polyquad. BAK wykazał się silniejszym działaniem toksycznym i mniejszą przeżywalnością komórek eksponowanych na jego działanie w porównaniu do PQ.

Badania na modelu linii komórkowej HCE-T ujawniły istotne różnice między profilem przenikalności poszczególnych preparatów okulistycznych zawierających latanoprost (Xaloptic, Xalatan i Monoprost), a także różnice w stopniu konwersji latanoprostu do formy farmakologicznie czynnej. Nie istniały znamienne statystycznie różnice w przenikalności preparatów Xaloptic i Xalatan jako formy kwasu (odpowiednio $P_{app\ LFA}$ wyniosły $5,49 \pm 1,64 \times 10^{-6}$ cm/s i $4,66 \pm 1,13 \times 10^{-6}$ cm/s). Spośród badanych preparatów Xaloptic najefektywniej przenikał przez błonę komórkową ($P_{app\ LFA+L} = 23,70 \pm 1,71 \times 10^{-6}$ cm/s) i w największym stopniu ulegał hydrolizie (współczynnik konwersji $28,13 \pm 5,85\%$). Spośród badanych preparatów przez barierę komórkową najslabiej przenikał Monoprost.

Różnice obserwowane w profilu przenikalności badanych preparatów latanoprostu wynikają przede wszystkim z ich składu. Pomimo znanego cytotoksycznego oddziaływania środków konserwujących oraz ubocznych efektów, które niekiedy występują po zastosowaniu leków z ich zawartością, preparaty przeciwjaskrowe zawierające chlorek benzalkonium cechuje znacznie lepsza przenikalność przez ciasne połączenia między komórkami nabłonka rogówki, a to może skutkować lepszą biodostępnością leku do tkanek oka.

Piśmiennictwo:

1. Antonik J, Cisek A, Smagur J: *Selvita – final report, In vitro permeability analysis of three different ophthalmic products containing 1 API (latanoprost) on optimized and validated human corneal epithelial cell culture model: study code: K8/JA/01*
2. Smędowski A, Paterno JJ, Toropainen E, Sinha D, Wylegala E, Kaarniranta K: *Excipients of preservative-free latanoprost induced inflammatory response and cytotoxicity in immortalized human HCE-2 corneal epithelial cells*. Journal of Biochemical and Pharmacological Research. 2014; 2(4): 175–184.
3. Kocic I: *Analiza porównawcza toksyczności środków konserwujących w preparatach okulistycznych*. Farmacja Praktyczna – Supplement 2014: 2–3. www.farmacjapraktyczna.pl
4. Hornof M, Toropainen E, Urtti A: *Cell culture of the ocular barriers*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005; 60: 207–225.
5. Ahuja M, Singh G, Majumdar DK: *Effect on formulation parameters on corneal permeability of Ofloxacin*. Sci Pharm. 2008; 76: 505–514.
6. Brignole-Baudouin F, Riancho L, Liang H, Baudouin C: *Comparative in vitro toxicology study of travoprost polyquad-preserved, travoprost BAK-preserved, and latanoprost BAK-preserved ophthalmic solutions on human conjunctival epithelial cells*. Curr Eye Res. 2011; 36(11): 979–988.
7. Epstein SP, Ahdo M, Marcus E, Asbell PA: *Comparative Toxicity of Preservatives on Immortalized Corneal and Conjunctival Epithelial Cells*. J Ocul Pharmacol Ther. 2009; 25(2): 113–119.
8. Ammar DA, Noecker RJ, Kahook MY: *Effects of benzalkonium chloride- and polyquad-preserved combination glaucoma medications on cultured human ocular surface cells*. Adv Ther. 2011 Jun; 28(6): 501–510.

Praca wpłynęła do Redakcji 18.08.2015 r. (KO-00025-2015)
Zakwalifikowano do druku 05.04.2016 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr n. med. Dorota Romaniuk
ul. Łąbedzia 10/7
40-521 Katowice
e-mail: d_romaniuk@hotmail.com