



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μορφοποίηση και in vitro Αξιολόγηση Γαλακτωμάτων Κυκλοσπορίνης Α με τη χρήση Πειραματικού Σχεδιασμού

Μ.Δ.Ε. ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΣΟΦΙΑ ΤΖΟΥΑΝΑΚΗ
Χημικός

Αθήνα 2016



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF PHARMACY
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY DIVISION

Formulation and in vitro evaluation of Cyclosporine A emulsion using Experimental Design technique

MSc INDUSTRIAL PHARMACY

SOFIA TZOUANAKI
Chemist

Athens 2016

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Π. Δάλλας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (επιβλέπων καθηγητής)

Δ. Ρέκκας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Μ. Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	7
Αντί προλόγου	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. Οφθαλμικά Σκευάσματα Κυκλοσπορίνης Α	14
1.1. Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κυκλοσπορίνης Α	14
1.2. Το Σύνδρομο της Ξηροφθαλμίας (Dry Eye Syndrome)	15
1.3. Οφθαλμικά Συστήματα Χορήγησης Κυκλοσπορίνης Α	23
2. Μικρογαλακτώματα	26
2.1. Θεωρία Μικρογαλακτωμάτων	26
2.2. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά	32
2.3. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων	38
3. Πειραματικός Σχεδιασμός	44
3.1. Ορισμοί	44
3.2. Πλεονεκτήματα Πειραματικού Σχεδιασμού	46
3.3. Στάδια Πειραματικού Σχεδιασμού	47
3.4. Είδη Πειραματικού Σχεδιασμού	48
4. Σκοπός	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57

1. Εξοπλισμός, Λογισμικά και Υλικά	58
1.1. Εξοπλισμός	58
1.2. Λογισμικά	59
1.3. Υλικά	59
2. Μέθοδοι	61
2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	61
2.2. Πειράματα Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού	63
2.3. Προκαταρκτικά Πειράματα Κατασκευής Διαγραμμάτων Φάσης	64
2.4. Πειραματικός Σχεδιασμός	65
2.5. Παρασκευή Γαλακτωμάτων	68
2.6. Παρασκευή Πρότυπου Γαλακτώματος	69
2.7. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυκλοσπορίνης	70
2.8. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων και ζ-Δυναμικού	70
2.9. Μελέτη Σταθερότητας	72
2.10. In vitro πειράματα διάχυσης	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	76
1.1. Εμφάνιση χρωματογραφήματος	76
1.2. Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές	76
2. Διαλυτότητα Κορεσμού Κυκλοσπορίνης	78

3. Προκαταρκτικά Πειράματα Κατασκευής Διαγραμμάτων Φάσης	80
4. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυκλοσπορίνης.....	83
5. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων Εσωτερικής Φάσης και ζ-Δυναμικού 84	
6. Μελέτη Σταθερότητας	88
6.1. Μακροσκοπική	88
6.2. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων Εσωτερικής Φάσης	88
7. In vitro Πειράματα Διάχυσης.....	90
8. Πειραματικός Σχεδιασμός.....	93
8.1. Απόκριση D_h	95
8.2. Απόκριση Q	97
8.3. Βελτιστοποίηση Μοντέλου	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
Βιβλιογραφία	107
Παράρτημα Α.....	119
Παράρτημα Β.....	123
Μελέτη Σταθερότητας	123
In vitro Αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης	124
Περίληψη	125
Abstract	128

Αντί προλόγου

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους του ανθρώπους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τα έτη 2015-2016. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη και η αξιολόγηση οφθαλμικών γαλακτωμάτων κυκλοσπορίνης Α.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κύριο Παρασκευά Δάλλα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την παρούσα εργασία, για την καθοδήγηση, την βοήθεια και την υπομονή του και μέχρι την ολοκλήρωση της.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Μαχαίρα τόσο για την ιδέα αυτής της εργασίας όσο και για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου προσέφερε. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την εταιρεία Rafarm S.A. για το ενδιαφέρον και τη δωρεάν παροχή της δραστικής ουσίας Κυκλοσπορίνη Α

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Δημήτρη Ρέκκα για το συνεχές ενδιαφέρον του και τις στοχευμένες παρατηρήσεις του σε πολλά στάδια της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Κωσταντίνο Δεμέτσο για την φιλοξενία στο εργαστήριο του καθώς και για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια του. Ιδιαίτερώ ευχαριστώ την Διδάκτορα Αναστασία Πίππα για βοήθεια και τη συμβολή της. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Λέκτορα κυρία Μαρία Βερτζώνη για τη σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση που προσέφερε στο αναλυτικό μέρος της εργασίας αυτής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συμφοιτητές μου για την έμπρακτη βοήθεια και τη συμπαράσταση τους. Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Μαρία Βατμανίδου και Θύμιο Νερούτσο και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Δανάη Γεωργακά, Αργυρώ Ταουκτσή και Σπύρο Γκίνη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα και τον πατέρα μου που μου προσέφεραν το όραμα, την υποστήριξη, την αγάπη και την υπομονή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α

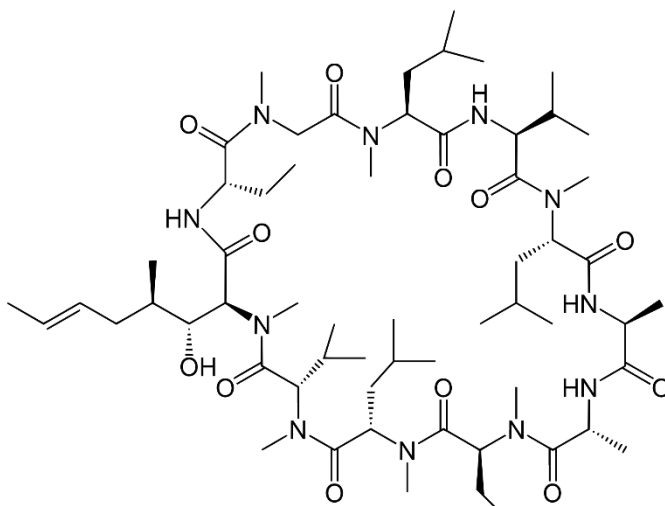
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1. Οφθαλμικά Σκευάσματα Κυκλοσπορίνης**
- 2. Μικρογαλακτώματα**
- 3. Πειραματικός Σχεδιασμός**

1. Οφθαλμικά Σκευάσματα Κυκλοσπορίνης Α

1.1. Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κυκλοσπορίνης Α

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα ουδέτερο, κυκλικό πεπτίδιο που αποτελείται από 11 αμινοξέα. Λαμβάνεται σαν λεπτή, λευκή κρυσταλλική σκόνη, ο χημικός της τύπος είναι $C_{12}H_{111}N_{11}O_{12}$ και το μοριακό της βάρος είναι 1202.61 Da [1]. Το μόριο της κυκλοσπορίνης περιέχει τέσσερις ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου που προσδίδουν στην κυκλική δομή της μεγάλη ακαμψία (Σχήμα 1) [2].



Σχήμα 1: Κυκλοσπορίνη Α

Αυτή η ασυνήθιστη δομή της κυκλοσπορίνης την καθιστά πρακτικά αδιάλυτη σε υδατικά μέσα, γεγονός που συντελεί στη μεταβλητή και ατελή απορρόφηση της από τα συμβατικά per os ή τοπικά σκευάσματα της [3]. Αντιθέτως έχει μεγάλη διαλυτότητα σε αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη, αιθέρα και χλωροφόρμιο. [4]

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κυκλοσπορίνης

Κυκλοσπορίνη Α	
Μοριακό βάρος (MW)	1202.61124 g/mol [1]
Υδατική Διαλυτότητα	6,6 µg/ml [5]
Σημείο τήξης	148-151 °C [1]
Συντελεστής κατανομής (LogP)	4,3 [6]
Κατάσταση	Λευκό κρυσταλλικό στερεό

Η τοπική κυκλοσπορίνη έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για την θεραπεία πολλών μορφών οφθαλμικής φλεγμονής, όπως η εαρινή επιπεφυκίτιδα [7], το σύνδρομο ξηροφθαλμίας (DES) [8], απόρριψη μοσχεύματος κερατοειδούς [9] και το σύνδρομο Sjögrens [10].

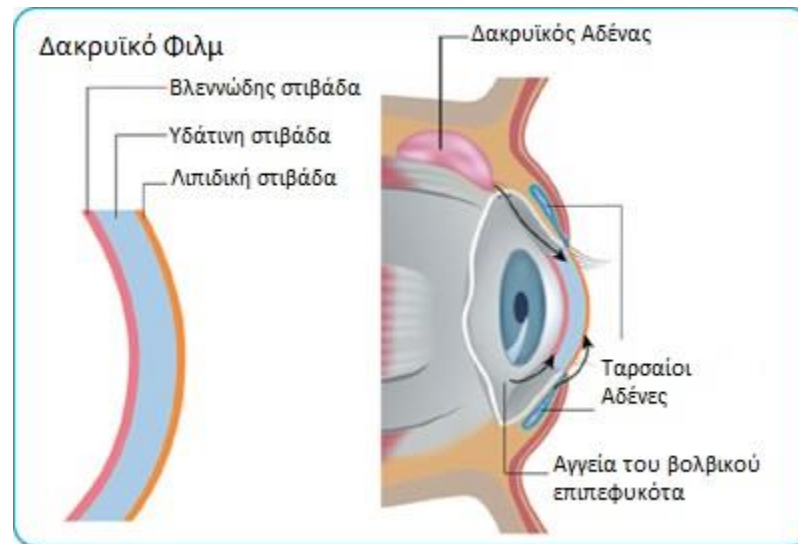
1.2. Το Σύνδρομο της Ξηροφθαλμίας (Dry Eye Syndrome)

1.2.1. Γενικά

Η ξηροφθαλμία είναι μία εξαιρετικά διαδεδομένη πάθηση. Σύμφωνα με την έκθεση του Dry Eye Workshop [11], το ποσοστό της ξηροφθαλμίας σε άτομα ηλικίας 50 ετών και άνω κυμαίνεται μεταξύ 5-30%. Επιπλέον εκτιμάται ότι περίπου 3,2 εκατομμύρια γυναίκες και 1,7 εκατομμύριο άνδρες, από συνολικά 4,9 εκατομμύρια ασθενείς 50 ετών και άνω, πάσχουν από ξηροφθαλμία. Δεκάδες εκατομμύρια περισσότεροι πάσχουν από ήπια ξηροφθαλμία, η οποία όμως εντείνεται με τη χρήση φακών επαφής ή λόγω χαμηλής υγρασίας του περιβάλλοντος. Τέλος έχει παρατηρηθεί μια αύξηση του ποσοστού των ατόμων που πάσχουν από ξηροφθαλμία κατά τα τελευταία χρόνια, λόγω της γενικότερης γήρανσης του πληθυσμού, αλλά και λόγω την αυξημένης χρήσης ορισμένων φαρμάκων [12] [13].

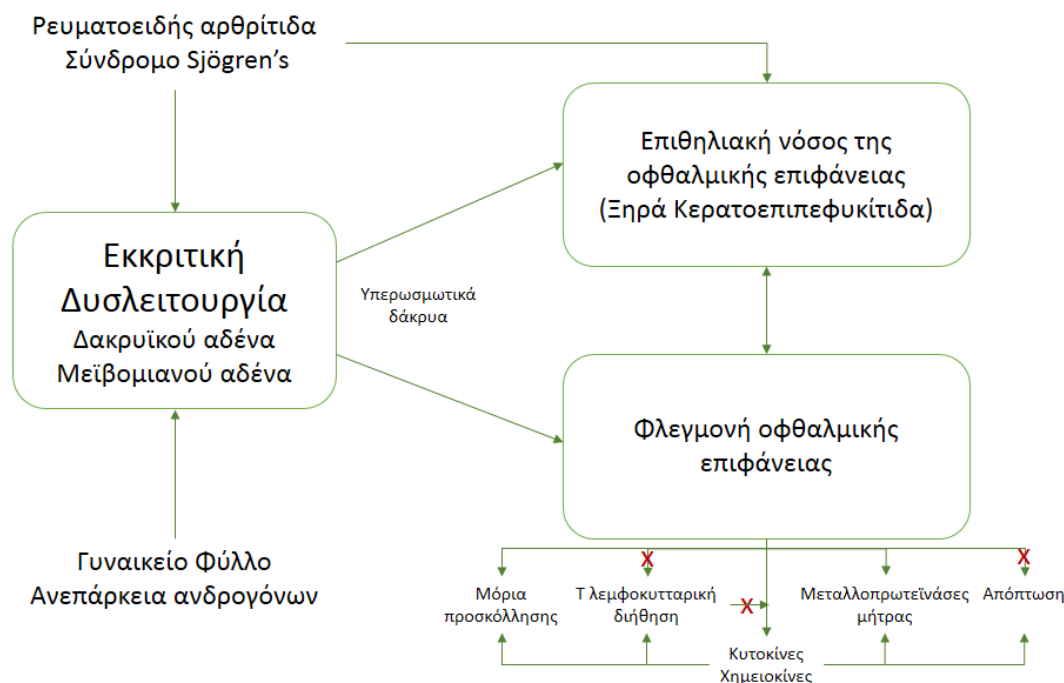
Το σύνδρομο της ξηροφθαλμίας (Dry Eye Syndrome), επίσης γνωστό ως ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα ή ξηρά κερατίτιδα είναι μια πολυπαραγοντική νόσος του Lacrimal Functional Unit (LFU). Το Lacrimal Functional Unit είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα του οφθαλμού που αποτελείται από τους δακρυϊκούς αδένες, την οφθαλμική επιφάνεια (κερατοειδής, επιπεφυκότας και ταρσαίοι αδένες), τα βλέφαρα και τα αισθητήρια και κινητήρια νεύρα που τα συνδέουν. Αυτή η λειτουργική μονάδα ελέγχει τα κύρια συστατικά του δακρυϊκού φιλμ τα οποία προσαρμόζονται αναλόγως στις περιβαλλοντικές και τις ενδοκρινολογικές συνθήκες. Ο βασικός ρόλος του είναι η διατήρηση της ακεραιότητας του δακρυϊκού φιλμ, της διαφάνειας του κερατοειδούς, και της ποιότητα της εικόνας που προβάλλεται πάνω στον αμφιβληστροειδή [11].

Τα δάκρυα αποτελούνται από τρεις στιβάδες (Σχήμα 2). Η βλεννώδης στιβάδα καλύπτει τον κερατοειδή χιτώνα (εξωτερική επιφάνεια του ματιού) δημιουργώντας μια χαμηλή σύνδεση με αυτόν ούτως ώστε το δάκρυ να παραμένει σταθερό επάνω στο μάτι. Το μεσαίο υδατώδες στρώμα παρέχει την απαιτούμενη υγρασία και μεταφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στον κερατοειδή χιτώνα. Αυτό το στρώμα αποτελείται από 98% νερό μαζί με μικρές ποσότητες από χλωριούχο νάτριο, πρωτεΐνες και άλλα συστατικά. Το εξωτερικό λιπώδες στρώμα δημιουργεί μια ελαιώδη μεμβράνη η οποία καλύπτει την δακρυϊκή στιβάδα και την προστατεύει από την εξάτμιση. Τα δάκρυα δημιουργούνται στους διάφορους αδένες που υπάρχουν γύρω από το μάτι. Το υδάτινο στρώμα παράγεται στον δακρυϊκό αδέν, ο οποίος βρίσκεται στην βάση του άνω βλεφάρου. Η εσωτερική βλεννώδης στιβάδα παράγεται από τον επιπεφυκότα ενώ η ελαιώδης στιβάδα παράγεται από τους ταρσαίους (μείβομιανούς) αδένες. Με κάθε βλεφαρισμό τα βλέφαρα απλώνουν τα δάκρυα επάνω στο μάτι. Τα δάκρυα που περισσεύουν κυλούν προς τους δύο μικρούς πόρους στην άκρη του ματιού κοντά στην μύτη. Οι πόροι αυτοί οδηγούν στα δακρυϊκά σωληνάκια τα οποία καταλήγουν στην ρινική κοιλότητα [14]



Σχήμα 2: Δομή δακρυϊκού συστήματος

Συνεπώς η ξηροφθαλμία είναι συνέπεια της μεταβολής στην ποιότητα ή στην ποσότητα των δακρύων που επαλείφουν τον κερατοειδή με αποτέλεσμα η λίπανση της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδή να είναι ανεπαρκής. Οφείλεται είτε στην αυξημένη εξάτμιση του δακρυϊκού φιλμ που καλύπτει την επιφάνεια του ματιού είτε στη μειωμένη παραγωγή δακρύων από τους ταρσαίους αδένες. Παρότι η οποιαδήποτε πάθηση του Lacrimal Functional Unit μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ή την επιδείνωση της ξηροφθαλμίας, οι βασικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην πάθηση είναι η υπερωσμωτικότητα των δακρύων και η αστάθεια του δακρυϊκού φιλμ [11]. Επίσης πλέον αναγνωρίζεται ότι αυτές οι αλλαγές στην σύνθεση δακρύων προάγουν φλεγμονές στην οφθαλμική επιφάνεια με πολλούς μηχανισμούς (Σχήμα 3) [15].



Σχήμα 3: Φλεγμονώδεις μεσολαβητές στην Ξηροφθαλμία και στόχοι αντιφλεγμονώδους θεραπείας με κυκλοσπορίνη [15].

Ένας ακόμη λόγος της μειωμένης παραγωγής δακρύων είναι η ηλικία, ιδιαίτερα στις γυναίκες, των οποίων η κατάσταση επιδεινώνεται λόγω των ορμονικών διαταραχών της εμμηνόπαυσης. Συστηματικά νοσήματα όπως οι κολλαγονώσεις (συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjögren), ο σακχαρώδης διαβήτης και νόσοι του θυρεοειδούς πιθανώς έχουν ως σύμπτωμα την ξηροφθαλμία. Επιπλέον η λήψη φαρμάκων (αντικαταθλιπτικά, αντισυλληπτικά αντυπερτασικά, αντισταμινικά), η διαθλαστική χειρουργική με excimer laser (PRK και LASIK), η χαμηλή πρόσληψη ωμέγα-3 απαραίτητων λιπαρών οξέων, και η θεραπεία με ακτινοβολία είναι μερικοί ακόμα λόγοι που μπορούν να οδηγήσουν στην ξηροφθαλμία [11] [16].

1.2.2. Συμπτώματα, Διάγνωση και Θεραπεία

Τα τυπικά συμπτώματα της ξηροφθαλμίας περιλαμβάνουν:

- αίσθηση καψίματος
- φαγούρα
- ερυθρότητα
- τσούξιμο
- πόνος
- αίσθηση ξένου σώματος στο μάτι
- δακρύρροια
- φωτοφοβία

Επιπλέον, οι ασθενείς με χρόνια, μη ελεγχόμενη νόσο μπορεί να διαμαρτυρηθούν για θολή όραση, μειωμένη ικανότητα παραγωγής δακρύων και δυσανεξία στους φακούς επαφής. Όπως προαναφέρθηκε είναι πιθανό να δημιουργηθούν ανωμαλίες στην οφθαλμική επιφάνεια όπως διάβρωση κερατοειδούς, βλάβες στο επιθήλιο και σε σοβαρές περιπτώσεις έλκη του κερατοειδούς [3]. Ως αποτέλεσμα αυτών των συμπτωμάτων, η ξηροφθαλμία μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην οπτική λειτουργία, τις καθημερινές δραστηριότητες, την παραγωγικότητα στο χώρο εργασίας, και φυσικά την ποιότητα ζωής [17]

Η διάγνωση της ξηροφθαλμίας γίνεται από τον οφθαλμίατρο, όπου μέσω της σχισμοειδής λυχνίας μπορεί διαπιστωθεί η ποσότητα των παραγομένων δακρύων. Μερικές φορές η εξέταση περιλαμβάνει μετρήσεις της παραγωγής των δακρύων, μια εκ των οποίων είναι και η «Schimer Test» [14]

Η θεραπεία της ξηροφθαλμίας εξαρτάται από τη σοβαρότητα της κατάστασης του ασθενούς. Ένα πρώτο βήμα είναι η εξάλειψη ή η ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών που αυξάνουν εξάτμιση και μειώνουν την παραγωγή των δακρύων. Τα τεχνητά δάκρυα ή τα οφθαλμικά λιπαντικά (χωρίς συντηρητικό) είναι συχνά αποτελεσματικά στην

ανακούφιση των συμπτωμάτων, ειδικά σε ήπιες περιπτώσεις. Ένας ακόμη τρόπος αντιμετώπισης της ξηροφθαλμίας είναι μέσω της διατροφής, με συμπληρώματα πλούσια σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, αλλά μέχρι στιγμής η έρευνα σε αυτόν τον τομέα είναι περιορισμένη και τα αποτελέσματα είναι ασαφή. Για τις βαριές μορφές ξηροφθαλμίας, μερικές φορές είναι απαραίτητη η απόφραξη των σωληναρίων που απομακρύνουν τα δάκρυα από το μάτι είτε προσωρινά με εισαγωγή βύσματος στο δακρυϊκό πόρο είτε μόνιμα με χειρουργική επέμβαση. Σοβαρές ή παρατεταμένες περιπτώσεις ξηροφθαλμίας μπορεί να απαιτούν χειρουργικές επεμβάσεις, όπως η χειρουργική επέμβαση βλεφάρου, ταρσοραφή είτε μεταμόσχευση βλεννογόνου, σιελογόνων αδένων ή αμνιακής μεμβράνης. Δεδομένου ότι η φλεγμονή είναι βασική παράμετρος της παθογένειας της ξηροφθαλμίας, έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από αντι-φλεγμονώδεις παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κορτικοστεροειδών, των τετρακυκλίνων, και της κυκλοσπορίνης [11].

1.2.3. Η Κυκλοσπορίνη Α στη θεραπεία της Ξηροφθαλμίας

Μηχανισμός Δράσης

Η κυκλοσπορίνη καταστέλλει ταυτόχρονα την έκφραση και την παραγωγή πολλών φλεγμονωδών δραστικών μορίων. Συνοπτικά, η κυκλοσπορίνη αναστέλλει εκλεκτικά την ενδοκυττάρια φωσφατάση καλσινευρίνη με επακόλουθο την αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-ATc και AP-1 στα T-λεμφοκύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την περεταίρω αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης των γονιδίων της Ιντερλευκίνης 2 (IL-2) και της Ιντερφερόνης γ (INF-γ), που οδηγεί σε αναστολή της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων [18] [19]. Επιπλέον μπορεί να αποτρέψει το άνοιγμα των πόρων παροδικής διαπερατότητας του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα την αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, και κατά συνέπεια της απόπτωσης (Σχήμα 3) [16]

Ο μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης βασίζεται στις δράση της ενάντια στη φλεγμονή του επιπεφυκότα και του δακρυϊκού αδένα, που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της

παραγωγής δακρύων και της διεύρυνσης των αγγείων του επιπεφυκότα. Η διεύρυνση των αγγείων του επιπεφυκότα έχει ιδιαίτερη σημασία, διότι εκτός από τη βελτίωση της υγείας της οφθαλμικής επιφάνειας, αυξάνεται η παραγωγή της βλεννώδους στοιβάδας του δακρυϊκού φιλμ, άρα βελτιώνεται και η ποιότητα του δακρυϊκού φιλμ [20].

Εμπορικά Σκευάσματα

Η δράση της κυκλοσπορίνης σαν θεραπεία κατά της ξηροφθαλμίας αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1989 όταν χρησιμοποιήθηκε σε σκύλους οι οποίοι εμφάνιζαν αυθόρμητη ξηρά κερατοεπιπεφυκίτιδα. Το αντίστοιχο εμπορικό σκεύασμα εγκρίθηκε το 1996 και έφερε το όνομα Optimmune [21]

Το Δεκέμβριο του 2002, ο FDA ενέκρινε το πρώτο σκεύασμα για την τοπική θεραπεία της οφθαλμικής φλεγμονής που έχει σαν αποτέλεσμα τη χρόνια ξηροφθαλμία. Το σκεύασμα αυτό ονομάζεται Restasis® και κυκλοφορεί από την εταιρεία Allergan. Είναι το μοναδικό μέχρι σήμερα εγκεκριμένο προϊόν για τη θεραπεία της ξηροφθαλμίας στην Αμερική. Πρόκειται για ένα ανιονικό λιπιδικό γαλάκτωμα κυκλοσπορίνης 0.05% που περιέχεται σε φιαλίδια μίας χρήσης. [22] Η ποσοτική σύσταση του σκευάσματος καθώς και ο ρόλος του κάθε συστατικού παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ποσοτική σύσταση εμπορικού προϊόντος Restasis [23]

Συστατικό	Ποσότητα (%w/w)	Ρόλος
CsA	0.05	Δραστική Ουσία
Castor oil	1.25	Λιπαρή (εσωτερική φάση)
Polysorbate 80	1.00	Γαλακτωματοποιητής
Pemulen	0.05	Σταθεροποιητής γαλακτώματος
Glycerin	2.20	Παράγοντας τονικότητας
pH	7.2 - 7.6	-

Το δεύτερο και πολύ πρόσφατα εγκεκριμένο εμπορικό προϊόν με κυκλοσπορίνη για τη θεραπεία της ξηροφθαλμίας βγήκε στην Ευρωπαϊκή αγορά στις 24 Ιουλίου 2015. Πρόκειται για το οφθαλμικό νανογαλάκτωμα Ikervis® της εταιρείας Santen. Χορηγείται για τη θεραπεία της βαριάς κερατίτιδας σε ενήλικες ασθενείς με ξηροφθαλμία, η οποία δεν έχει βελτιωθεί παρά τη θεραπεία με υποκατάστατα δακρύων. Έχει τη διπλάσια περιεκτικότητα σε κυκλοσπορίνη (0.1%) από το Restasis® και σαν επιπλέον ισχυρισμό φέρει την κατιονική του φύση (Novarorb Technology της εταιρείας Novagali Pharma), που μέσω ενός μηχανισμού δράσης οδηγεί σε drug reservoir effect και συνεπώς βελτιωμένη απορρόφηση της κυκλοσπορίνης. [24]. Η ποσοτική σύσταση του σκευάσματος καθώς και ο ρόλος του κάθε συστατικού παρατίθενται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ποσοτική σύσταση εμπορικού προϊόντος Ikervis [24]

Συστατικό	Ποσότητα (%w/w)	Ρόλος
CsA	0.05 - 0.3	Δραστική Ουσία
MCT	0.5 - 4	Λιπαρή (εσωτερική φάση)
BAK	0.02	Κατιονικός παράγοντας
Tyloxapol	0.3	Γαλακτωματοποιητής
Poloxamer 188	1	Σταθεροποιητής γαλακτώματος
Vit E	0.01	Αντιοξειδωτικό
Glycerin	2.25	Παράγοντας τονικότητας



Εικόνα 1: Εμπορικά οφθαλμικά σκευάσματα κυκλοσπορίνης Restasis® (Αριστερά) και Ikervis® (Δεξιά)

1.3. Οφθαλμικά Συστήματα Χορήγησης Κυκλοσπορίνης Α

Ένα ιδανικό οφθαλμικό σκεύασμα πρέπει να πληροί διάφορες προδιαγραφές:

- η σύνθεση του πρέπει να είναι ανεκτή από το μάτι
- να είναι εύκολο να χορηγηθεί
- το δραστικό συστατικό να έχει αυξημένο χρόνο παραμονής στο μάτι
- να μην παρουσιάζεται συστηματική απορρόφηση
- να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής
- να παρασκευάζεται όσο το δυνατόν ευκολότερα και φθηνότερα

Μία επιπλέον πολύ βασική δυσκολία είναι ότι δεν είναι δυνατό να παρασκευαστούν τα ευρέως χρησιμοποιούμενα οφθαλμικά υδατικά σχήματα λόγω της μεγάλης υδροφοβίας και της χαμηλής υδατικής διαλυτότητας της κυκλοσπορίνης [3].

Έχουν αναπτυχθεί σε ερευνητικό επίπεδο πολυάριθμα τοπικά σκευάσματα με στόχο να βελτιωθεί η οφθαλμική διείσδυση, η μείωση της τοξικότητας, και η βελτίωση της ανεκτικότητας της κυκλοσπορίνης. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται επιγραμματικά όλα τα υγρά οφθαλμικά συστήματα χορήγησης της Κυκλοσπορίνης, καθώς και μερικά από τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους.

Πίνακας 4: Υγρά Οφθαλμικά συστήματα χορήγησης Κυκλοσπορίνης Α

Σύστημα Χορήγησης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Πηγή
Έλαια	Μεγάλη ικανότητα διαλυτοποίησης της κυκλοσπορίνης	Χαμηλή οφθαλμική ανεκτικότητα και διαθεσιμότητα Μικρός χρόνος ζωής	[25]
α-Κυκλοδεξτρίνες	Ενισχυμένη διείσδυση στον κερατοειδή	Συχνές χορηγήσεις	[26]
Επιταχυντές Διαβατότητας	Ενισχυμένη διείσδυση στον κερατοειδή	Χαμηλή οφθαλμική ανεκτικότητα	[27] [28]
Μικκύλια	Υψηλές συγκεντρώσεις στον κερατοειδή στις 24 ώρες	Χαμηλή οφθαλμική ανεκτικότητα Σταθερότητα των μικκυλίων	[29]
Ανιονικά Γαλακτώματα	Βελτίωση συμπτωμάτων ξηροφθαλμίας (Restasis → εγκεκριμένο από τον FDA)	Αίσθημα καύσου	[22]
Κατιονικά Γαλακτώματα	Υψηλά επίπεδα και αυξημένος χρόνος παραμονής στον κερατοειδή, (Ikervis → εγκεκριμένο από τον EMA)	Υπό αξιολόγηση	[24]
PLGA και CD Νανοσωματίδια	Ενισχυμένος χρόνος παραμονής Υψηλή κυτταρική πρόσληψη	Οφθαλμική ανεκτικότητα υπό αξιολόγηση	[30]
PACA Νανοσωματίδια	Βελτιωμένη απορρόφηση από τον κερατοειδή	Χαμηλή οφθαλμική ανεκτικότητα	[31]
Νανοσωματίδια Χιτοζάνης	Υψηλή ανεκτικότητα Υψηλές συγκεντρώσεις στο εξωτερικό του οφθαλμού	Η φυσική προέλευση της χιτοζάνης	[32]
Λιποσώματα	Υψηλές συγκεντρώσεις	Ακριβή και απαιτητική παρασκευή Πολύ γρήγορη Κάθαρση Ερεθιστικά επιφανειοδραστικά	[33]
Cys-PEG-SA-Νανομεταφορείς Λιπιδίων	High concentrations & SR	Οφθαλμική ανεκτικότητα υπό αξιολόγηση	[34]

Επιπλέον σε φαρμακεία νοσοκομείων παρασκευάζονται εναιωρήματα κυκλοσπορίνης σε τεχνητά δάκρυα [35] αλλά και διαλύματα κυκλοσπορίνης σε έλαια όπως το

καλαμποκέλαιο, το καστορέλαιο κ.α. [36] σαν γαληνικά σκευάσματα υπό τη μορφή εξατομικευμένων κολλυρίων.

Τα πλεονεκτήματα των γαλακτωμάτων έναντι των υπολοίπων φαρμακοτεχνικών μορφών είναι αρκετά. Η βιομηχανική παραγωγή και η αποστείρωση τους είναι σχετικά απλές και ανέξοδες. Επιπλέον, ανάλογα με την λιπαρή φάση που θα χρησιμοποιηθεί μπορούν να διαλυτοποιήσουν ακόμα και τα πιο λιπόφιλα μόρια [37].

Στην περίπτωση των submicron γαλακτωμάτων (γαλακτώματα με μέγεθος σταγονιδίων εσωτερικής φάσης μικρότερο των 100 nm) τα πλεονεκτήματα είναι ακόμη περισσότερα. Πρώτων αποτελούν σταθερότερα συστήματα, με μεγάλη διάρκεια ζωής και αντιστέκονται στη συσσωμάτωση των σταγονιδίων της εσωτερικής τους φάσης και τον διαχωρισμό τους λόγω βαρύτητας [38] [39]. Δεύτερον, περιέχουν σταγονίδια που σκεδάζουν ασθενώς τα κύματα φωτός, και έτσι είναι κατάλληλα για ενσωμάτωση σε προϊόντα τα οποία πρέπει να είναι οπτικά διαυγή ή ελαφρώς θολά [40] [41]. Τρίτον, μπορούν συχνά να σχεδιαστούν ώστε να έχουν νέες ρεολογικές ιδιότητες, π.χ., υψηλό ιξώδες ή χαρακτηριστικά γέλης [42] [38] [41]. Το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί πλεονέκτημα για ένα οφθαλμικό σκεύασμα. Τέταρτον, μπορεί να είναι σε θέση να αυξήσουν την βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων τύπων λιπόφιλων δραστικών ουσιών ενσωματωμένα στην εσωτερική τους φάση, φαινόμενο που εν μέρει αποδίδεται στην απότομη αύξηση της διαλυτότητας λιπόφιλων ενώσεων στο νερό κάτω από ένα κρίσιμο μέγεθος σωματιδίων, η οποία οφείλεται σε αυξημένη πίεση Laplace [43] [44] [42].

2. Μικρογαλακτώματα

2.1. Θεωρία Μικρογαλακτωμάτων

2.1.1. Ορισμός και Ιστορική αναδρομή

Ένας από τους πιο ακριβείς ορισμούς των μικρογαλακτωμάτων έχει δοθεί από τους Danielsson και Lindman: “Το μικρογαλάκτωμα είναι ένα σύστημα νερού, ελαίου και ενός αμφίφιλου μορίου το οποίο είναι ένα ενιαίο, οπτικά ισοτροπικό και θερμοδυναμικά σταθερό υγρό διάλυμα” [45].

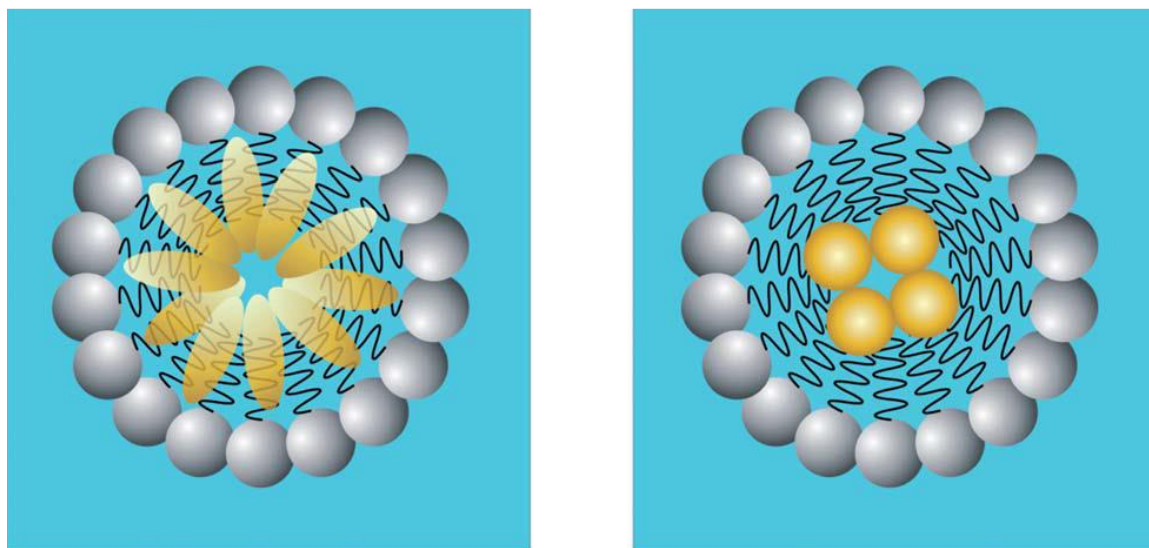
Τα μικρογαλακτώματα δεν είχαν παρουσιαστεί βιβλιογραφικά μέχρι την εργασία των Hoar και Schulman το 1943 οι οποίοι ανέφεραν την αυθόρμητη δημιουργία γαλακτώματος νερού και ελαίου με την προσθήκη ενός ισχυρού επιφανειοδραστικού παράγοντα [46]. Ωστόσο ο όρος «μικρογαλάκτωμα» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ακόμη πιο μετά από τους Schulman et al. [47] το 1959 για να περιγράψει ένα πολυφασικό σύστημα που αποτελούνταν από νερό, λάδι, επιφανειοδραστικό και αλκοόλη και σχημάτιζε ένα διαφανές διάλυμα. Παρά το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιούνται συστηματικά σήμερα, στη βιβλιογραφία συναντώνται οι όροι “γαλάκτωμα μικκυλίων” [48] ή “διογκωμένα μικκύλια”. Τα μικρογαλακτώματα πιθανότατα ανακαλύφθηκαν πολύ πριν από τις μελέτες του Schulman. Το ενδιαφέρον για τα μικρογαλακτώματα ξεκίνησε λόγω της πεποίθησης ότι μπορούν να βελτιώσουν την ανάκτηση του πετρελαίου, σήμερα έχουν πολλές ακόμα εφαρμογές π.χ., κατάλυση, παρασκευή submicron σωματιδίων, εκχύλιση υγρού-υγρού, απορρόπηση, λίπανση και ως φορείς δραστικών ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα.

2.1.2. Δομή και Ιδιότητες

Τα μικρογαλακτώματα είναι υγρά ισότροπα συστήματα διασποράς, μετρίου ιξώδους τα οποία συμπεριφέρονται σαν Νευτώνια υγρά. Είναι θερμοδυναμικά σταθερά και θεωρητικά ο σχηματισμός τους είναι αυθόρμητος, δηλαδή δεν απαιτείται προσφορά ενέργειας [49]. Στην πράξη, ένα μικρογαλάκτωμα μπορεί να μην σχηματιστεί αυθόρμητα λόγω παρουσίας

κινητικών ενεργειακών φραγμών ή/και αργών διαδικασιών μεταφοράς μάζας. Κατά συνέπεια, μπορεί να είναι απαραίτητη η μηχανική ανάδευση ή η θέρμανση του συστήματος προκειμένου να παρασκευαστεί ένα μικρογαλάκτωμα από τα συστατικά του [50].

Η δομή των ο/w μικρογαλακτωμάτων είναι παρόμοια με αυτή των συμβατικών/μάκρο γαλακτωμάτων. Τα επιφανειοδραστικά μόρια οργανώνονται έτσι ώστε οι μη πολικές ουρές τους να συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα υδρόφοβο πυρήνα. Με τη διάταξη αυτή μειώνεται η θερμοδυναμικά δυσμενής επιφάνεια επαφής μεταξύ μη πολικών ομάδων και νερού. Οι υδρόφιλες ομάδες της κεφαλής των μορίων του επιφανειοδραστικού προεξέχουν μέσα στο περιβάλλον της υδατικής φάσης. Τα μόρια του ελαίου μπορεί να είναι ενσωματωμένα μέσα στο υδρόφοβο εσωτερικό του μικκυλίου ως ένας ξεχωριστός πυρήνας ή μεταξύ των υδρόφοβων ουρών (Σχήμα 4). Αν τα μόρια του ελαίου έχουν κάποια πολική ομάδα, τότε αυτά είτε ενσωματώνονται εντός του μικκυλίου κατά τέτοιο τρόπο ώστε αυτές οι ομάδες αυτές να αλληλεπιδρούν με τις πολικές ομάδες της κεφαλής είτε προεξέχουν σε κάποια απόσταση μέσα στο νερό [50].



Σχήμα 4: Δομή ο/w μικρογαλακτωμάτων [50]

2.1.3. Θεωρία του σχηματισμού

Μια απλοποιημένη περιγραφή του σχηματισμού μικρογαλακτώματος είναι να φανταστούμε την διασπορά της εσωτερικής φάσης σε πολύ μικρά σταγονίδια. Η ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού του μικρογαλακτώματος μπορεί να θεωρηθεί ότι εξαρτάται από το βαθμό στον οποίο το επιφανειοδραστικό μειώνει την επιφανειακή τάση της διεπιφάνειας ελαίου-νερού και από την αλλαγή στην εντροπία του συστήματος, έτσι ώστε

$$\Delta G_{form} = \gamma_{o/w} \Delta A - T \Delta S$$

Όπου ΔG_{form} : η ελεύθερη ενέργεια σχηματισμού του μικρογαλακτώματος

$\gamma_{o/w}$: η διεπιφανειακή τάση ελαίου-νερού

ΔA : η αλλαγή στην επιφάνεια επαφής κατά το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος

T : η θερμοκρασία εκφρασμένη σε βαθμούς Kelvin, και

ΔS : η μεταβολή της εντροπίας του συστήματος, δηλαδή η εντροπία διασποράς

Κατά τη διασπορά, το αριθμός των σταγονιδίων αυξάνεται και η ΔS είναι θετική. Εάν το επιφανειοδραστικό έχει την ικανότητα να μειώσει την διεπιφανειακή τάση ($\gamma_{o/w}$) σε μία επαρκώς χαμηλή τιμή, η ενέργεια $\Delta A \gamma_{o/w}$ θα είναι σχετικά μικρή και θετική, επιτρέποντας έτσι μια αρνητική (και ως εκ τούτου ευνοϊκή) αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας, δηλαδή, αυθόρμητη μικρογαλακτωματοποίηση. [51]

2.1.4. Μάκρο, μικρο και νανογαλακτώματα

Διαφορές και ομοιότητες μικρο και μακρογαλακτωμάτων

Από ορισμένες απόψεις, τα μικρογαλακτώματα μπορούν να θεωρηθούν ως μικρής κλίμακας εκδοχές των γαλακτωμάτων, δηλαδή, συστήματα διασποράς είτε του ελαίου σε νερό (o / w) είτε νερού-σε-έλαιο (w / o), με ένα εύρος ακτίνας σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης της τάξεως των νανόμετρων. Μια τέτοια περιγραφή, όμως, στερείται ακρίβειας, δεδομένου ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ μικρογαλακτωμάτων και των απλών γαλακτωμάτων (μακρογαλακτωμάτων).

Ειδικότερα, σε ένα τυπικό γαλακτώματα το μέσο μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης μεγαλώνει συνεχώς με το χρόνο, ώσπου τελικά θα λάβει χώρα ο διαχωρισμός των δύο φάσεων λόγω των βαρυντικών δυνάμεων. Τα μακρογαλακτώματα είναι δηλαδή θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα και ο σχηματισμός τους απαιτεί προσφορά ενέργειας. Μία ακόμα βασική διαφορά είναι ότι το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης είναι σχετικά μεγάλο ($> 0,1 \mu\text{m}$). Αυτό έχει σαν συνέπεια την αντανάκλαση της ηλιακής ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να έχουν αδιάφανο λευκό χρώμα.

Αντίθετα για τα μικρογαλακτώματα, όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, ο σχηματισμός είναι τους αυθόρμητος. Αποτελούν δηλαδή θερμοδυναμικά σταθερά συστήματα που δεν αλλοιώνονται με την πάροδο του χρόνου και θεωρητικά δεν απαιτείται προσφορά ενέργειας για τον σχηματισμό τους. Αυτή η θεμελιώδης ιδιότητα τους είναι και το κύριο χαρακτηριστικό που τα διαχωρίζει από τα υπόλοιπα είδη γαλακτωμάτων. Οφείλεται στην εξαιρετικά χαμηλή διεπιφανειακή τάση μεταξύ των φάσεων ελαίου και ύδατος ($\gamma_{o/w}$) που προκύπτει από την δράση του επιφανειοδραστικού. Πιο συγκεκριμένα ο ρόλος του επιφανειοδραστικού είναι να μειώσει την $\gamma_{o/w}$ επαρκώς - δηλαδή μείωση της ενέργειας που απαιτείται για την αύξηση του εμβαδού επιφάνειας - έτσι ώστε να λάβει χώρα αυθόρμητα η διασπορά των σταγονιδίων του νερού ή του λαδιού και να προκύψει ένα θερμοδυναμικά σταθερό σύστημα [50] [42]. Άλλο ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των μικρογαλακτωμάτων είναι η διαφάνεια τους λόγω της μεγάλης διασποράς της εσωτερικής τους φάσης, η ακτίνα της οποίας είναι μικρότερη από $1000 \text{ \AA}$ (100 nm) [37].

Διαφορές και ομοιότητες μικρο και νανογαλακτωμάτων

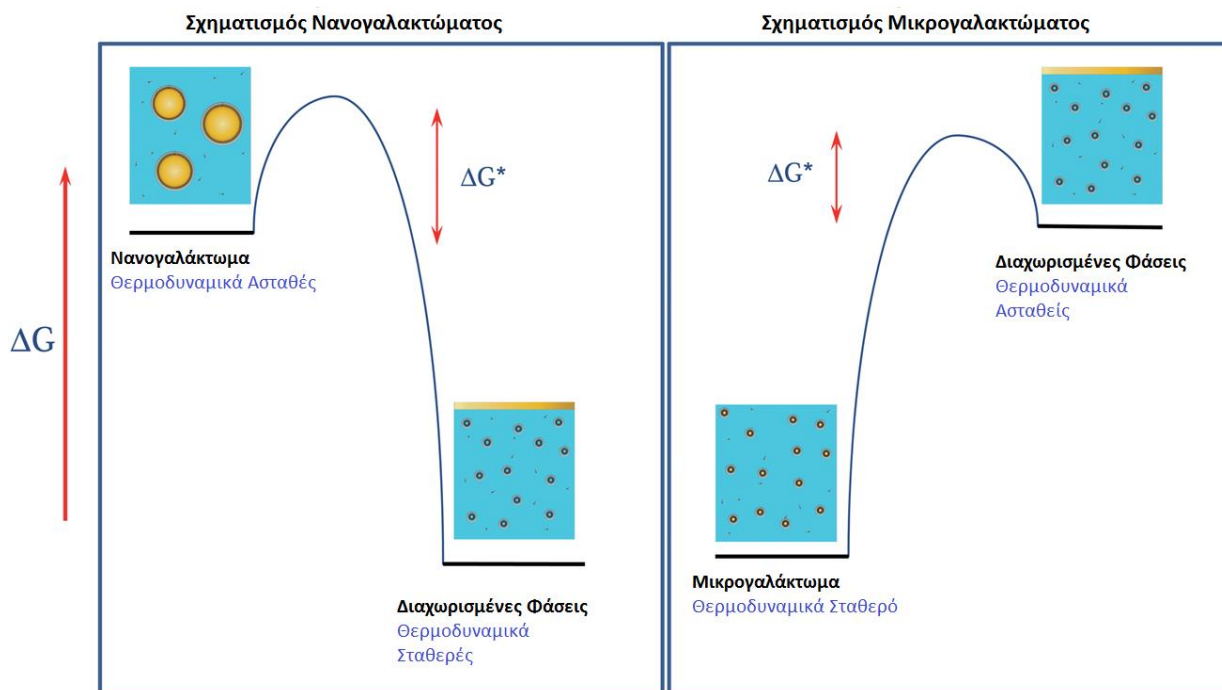
Τα μικρο και τα νάνο γαλακτώματα έχουν κάποιες κοινές δομικές ιδιότητες που καθιστούν δύσκολο τον διαχωρισμό τους. Αποτελούν τις δύο κατηγορίες των submicron γαλακτωμάτων και χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι η διαφάνεια τους, Ωστόσο παρά τις δομικές ομοιότητες μεταξύ των μικρογαλακτωμάτων και των νανογαλακτωμάτων, υπάρχουν ορισμένες σημαντικές διαφορές. Υπάρχει μεγάλη σύγχυση στην επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά με την ακριβή φύση αυτών των διαφορετικών συστημάτων, και έχουν γίνει πολλά λάθη κατά την ταξινόμηση τους. Για παράδειγμα, ορισμένοι ερευνητές

έχουν παρασκευάσει σαφώς μικρογαλακτώματα, αλλά αναφέρονται σε αυτά ως νανογαλακτώματα, και το αντίστροφο [50]. Ένας σημαντικός λόγος για τη σύγχυση αυτή είναι τα προθέματα που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό τους. Ο όρος " μικρο " σημαίνει 10^{-6} , ενώ ο όρος " νανο " 10^{-9} , πράγμα που θα σήμαινε ότι τα νανογαλακτώματα περιέχουν σωματίδια που είναι μικρότερα από εκείνα των μικρογαλακτωμάτων, στην πράξη όμως συνήθως συμβαίνει το αντίθετο. Η αιτία για αυτή την συγκεχυμένη ορολογία είναι αποτέλεσμα της ιστορικής εξέλιξης του τομέα της κolloειδούς επιστήμης. Ο όρος "μικρογαλάκτωμα" είχε καθιερωθεί μεταξύ των ερευνητών πολύ πριν εισαχθεί ο όρος "νανογαλάκτωμα". Παρ' όλα αυτά είναι προφανές ότι οι κolloειδείς διασπορές που τώρα θα ονομάζονταν "νανογαλακτώματα" είχαν σίγουρα παρασκευαστεί πολύ νωρίτερα από την καθιέρωση του όρου. [50]

Δεν υπάρχει ένα μοναδικό μέγεθος σωματιδίων που να μπορεί να καθορίσει με σαφήνεια το ανώτατο όριο μεγέθους σωματιδίων για ένα μικρογαλάκτωμα [50]. Η στοιβάδα του επιφανειοδραστικού που καλύπτει τα σταγονίδια της εσωτερικής φάσης έχει μία βέλτιστη καμπυλότητα (εκεί όπου η διεπιφανειακή τάση είναι εξαιρετικά χαμηλή), η οποία εξαρτάται από τη μοριακή γεωμετρία του επιφανειοδραστικού και πιο συγκεκριμένα από το packing parameter [52]. Ως εκ τούτου μπορούν να σχηματισθούν μικρογαλακτώματα με πολλά διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων που θα αντιστοιχούν στις διάφορες βέλτιστες καμπυλότητες του κάθε επιφανειοδραστικού.

Ο πιο θεμελιώδης τρόπος για τη διάκριση νανογαλακτωμάτων και μικρογαλακτωμάτων είναι και πάλι η θερμοδυναμική τους σταθερότητα: τα νανογαλακτώματα σε αντίθεση τα μικρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο συστημάτων περιγράφεται στο Σχήμα 5, στο οποίο συγκρίνεται η ελεύθερη ενέργεια των κolloειδών διασπορών με την ελεύθερη ενέργεια των διαχωρισμένων φάσεων από τις οποίες παρασκευάζονται (δηλαδή από λάδι και ένα υδατικό διάλυμα επιφανειοδραστικού). Συνέπεια των παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι τα μικρογαλακτώματα παραμένουν κινητικά σταθερά κάτω από ένα συγκεκριμένο εύρος συνθηκών (π.χ., θερμοκρασίες

σύνθεσης και αποθήκευσης), ενώ τα νανογαλακτώματα θα διασπαστούν με την πάροδο του χρόνου, με ρυθμό που εξαρτάται από το ύψος του ΔG (Σχήμα 5) [50].



Σχήμα 5: Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης της ελεύθερης ενέργειας των κolloειδών συστημάτων σε σχέση με την κατάσταση διαχωρισμού των φάσεων. Οι δύο καταστάσεις χωρίζονται από μια ενέργεια ενεργοποίησης ΔG^* [50]

Τέλος, από άποψης σύστασης τα δύο είδη γαλακτωμάτων τυπικά απαιτούν τα ίδια συστατικά για να παρασκευαστούν. Ωστόσο για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων συνήθως απαιτείται μεγαλύτερη αναλογία επιφανειοδραστικού-ελαίου σε σχέση με τα νανογαλακτώματα. Σε γενικές γραμμές, τα νανογαλακτώματα μπορούν να παρασκευαστούν από ένα ευρύτερο φάσμα επιφανειοδραστικών παραγόντων σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα. Συνήθως, μόνο επιφανειοδραστικά με μικρά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων επειδή μόνο αυτά είναι σε θέση να παράγουν εξαιρετικά χαμηλές διεπιφανειακές τάσεις σε συγκεκριμένες στοιβάδες καμπυλότητας. [50]

2.2. Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά

2.2.1. Τύποι μικρογαλακτωμάτων κατά Winsor

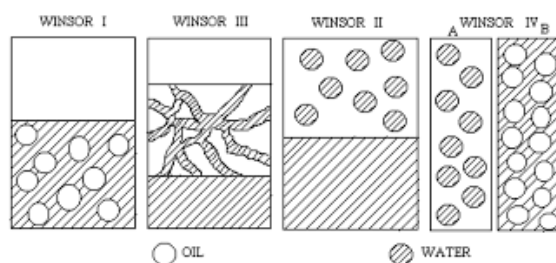
Μία πολύ γνωστή κατάταξη μικρογαλακτωμάτων είναι αυτή κατά Winsor, ο οποίος προσδιόρισε τέσσερις γενικούς τύπους φάσης ισορροπίας [53]:

Τύπος I: το επιφανειοδραστικό είναι υδατοδιαλυτό και σχηματίζεται ο/w τύπος μικρογαλακτώματος (Winsor I). Η υδατική φάση πλούσια σε επιφανειοδραστικό συνυπάρχει με την ελαιώδη φάση, όπου το επιφανειοδραστικό είναι παρόν μόνο ως μονομερές σε μικρή συγκέντρωση.

Τύπος II: το επιφανειοδραστικό είναι κυρίως διαλυτό στην ελαιώδη φάση και σχηματίζονται w/o μικρογαλακτώματα. Η ελαιώδης φάση πλούσια σε επιφανειοδραστικό συνυπάρχει με την φτωχή σε επιφανειοδραστικό υδατική φάση (Winsor II).

Τύπος III: είναι ένα σύστημα τριών φάσεων, όπου μια μεσαία φάση πλούσια σε επιφανειοδραστικό συνυπάρχει με περίσσειες σε υδατική και ελαιώδη φάσεις που είναι όμως φτωχές σε επιφανειοδραστικό. (Winsor III ή μικρογαλάκτωμα μεσαίας φάσης).

Τύπος IV: πρόκειται για ένα μονοφασικό (ισότροπο) διάλυμα μικκυλίων, που σχηματίζεται με την προσθήκη μιας επαρκούς ποσότητας αμφίφιλου μορίου (επιφανειοδραστικό συν αλκοόλη).



I III II IV

Σχήμα 6: Τύποι μικρογαλακτωμάτων κατά Winsor [54]

Ανάλογα με τον τύπο επιφανειοδραστικού και το περιβάλλον του μικρογαλακτώματος σχηματίζονται οι τύποι I, II, III ή IV, το ποιος θα είναι ο κυρίαρχος τύπος σχετίζεται με με το R-Ratio και το packing parameter. Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 5 προκύπτουν μεταβάσεις φάσης λόγω αύξησης διαφόρων μεταβλητών [55].

Πίνακας 5: Ποιοτική επίδραση διάφορων μεταβλητών στις φάσεις των μικρογαλακτωμάτων

Αύξηση Μεταβλητής	Μετάβαση
Αλατότητα (Salinity)	WI → WIII → WII
Έλαιο: αριθμός ατόμων άνθρακα	WII → WIII → WI
Αλκοόλη: με χαμηλό MW	WII → WIII → WI
με υψηλό MW	WI → WIII → WII
Επιφανειοδραστικό: μήκος λιπόφιλης αλυσίδας	WI → WIII → WII
Θερμοκρασία: για ανιονικά επιφανειοδραστικά	WII → WIII → WI
για μη ιονικά επιφανειοδραστικά	WI → WIII → WII

2.2.2. R-ratio

Το R- ratio προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Winsor [53] για την εξήγηση της επίδρασης των αμφίφιλων μορίων και των διαλυτών στην διεπιφανειακή καμπυλότητα. Η κύρια ιδέα ήταν να συσχετιστούν οι ενέργειες της αλληλεπίδρασης μεταξύ της στοιβάδας του αμφίφιλου μορίου και των περιοχών έλαιου και νερού. Επομένως, το R-ratio συγκρίνει την τάση ενός αμφίφιλου μορίου να διασπαρεί σε λάδι με την τάση τους να διαλυθεί στο νερό. Αν ευνοείται μία φάση, η διεπιφανειακή περιοχή τείνει να λάβει μια συγκεκριμένη καμπυλότητα. Ο Winsor εξέφρασε ποιοτικά αυτή την τάση της διασποράς με την παρακάτω εξίσωση:

$$R = \frac{A_{CO}}{A_{CW}}$$

όπου A_{CO} : η ενέργεια συνοχής μεταξύ επιφανειοδραστικού και ελαίου

A_{CW} : η ενέργεια συνοχής μεταξύ επιφανειοδραστικού και ύδατος

Για να ληφθεί υπόψη η δομή του ελαίου και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων επιφανειοδραστικού, προτάθηκε μια εκτεταμένη εκδοχή του αρχικού R-ratio [56]

$$R = \frac{A_{CO} - A_{OO} - A_{LL}}{A_{CW} - A_{WW} - A_{HH}}$$

όπου A_{OO} : η ενέργεια αλληλεπίδρασης ελαίου-ελαίου

A_{LL} : η ενέργεια αλληλεπίδρασης υδρόφοβου-υδρόφοβου τμήματος του επιφανειοδραστικού

A_{WW} : η ενέργεια αλληλεπίδρασης νερού-νερού

A_{HH} : η ενέργεια αλληλεπίδρασης υδρόφιλου-υδρόφιλου τμήματος του επιφανειοδραστικού

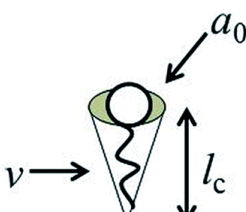
Έτσι, αν για παράδειγμα $R > 1$, τείνει να αυξηθεί η επιφάνεια της επαφής του επιφανειοδραστικού με το λάδι, ενώ μειώνεται περιοχή επαφής με το νερό. Έτσι το έλαιο τείνει να καταστεί η συνεχής φάση και το αντίστοιχο χαρακτηριστικό σύστημα θα είναι τύπου II (Winsor II). Αντίστοιχα, μια ισορροπημένη στοιβάδα διεπαφής αντιπροσωπεύεται από το $R = 1$.

2.2.3. Packing Parameter

Οι αλλαγές στην καμπυλότητα της μεμβράνης και ο τύπος μικρογαλακτώματος μπορούν να εξηγηθούν ποσοτικά με όρους γεωμετρίας. Η έννοια αυτή εισήχθη από τους Israelachvili et al. [57] και χρησιμοποιείται ευρέως για να συσχετίσει τη μοριακή δομή του επιφανειοδραστικού με την δομή της διεπιφάνειας. Η καμπυλότητα της στοιβάδας του επιφανειοδραστικού εξαρτάται από τις σχετικές επιφάνειες της υδρόφιλης κεφαλής του, a_o , και της υδρόφοβης ουράς του, v/l_c

- Αν $a_o > v/l_c$, τότε σχηματίζεται ένα o/w μικρογαλάκτωμα,
- Αν $a_o < v/l_c$, τότε σχηματίζεται ένα w/o μικρογαλάκτωμα,
- Αν $a_o \approx v/l_c$, τότε η προτιμώμενη δομή είναι ένα μικρογαλάκτωμα μεσαίας φάσης (WIII).

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι δομές που δημιουργούνται από τις διάφορες τιμές που μπορεί να λάβει το packing parameter.



$$CPP = v/a_0 l_c$$

Critical Packing Parameter ($v/a_0 l_c$)	Critical Packing Shape	Structures Formed
$< 1/3$	Cone	Spherical micelles
$1/3 - 1/2$	Truncated cone	Cylindrical micelles
$1/2 - 1$	Truncated cone	Flexible bilayers, vesicles
~ 1	Cylinder	Planar bilayers
> 1	Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles

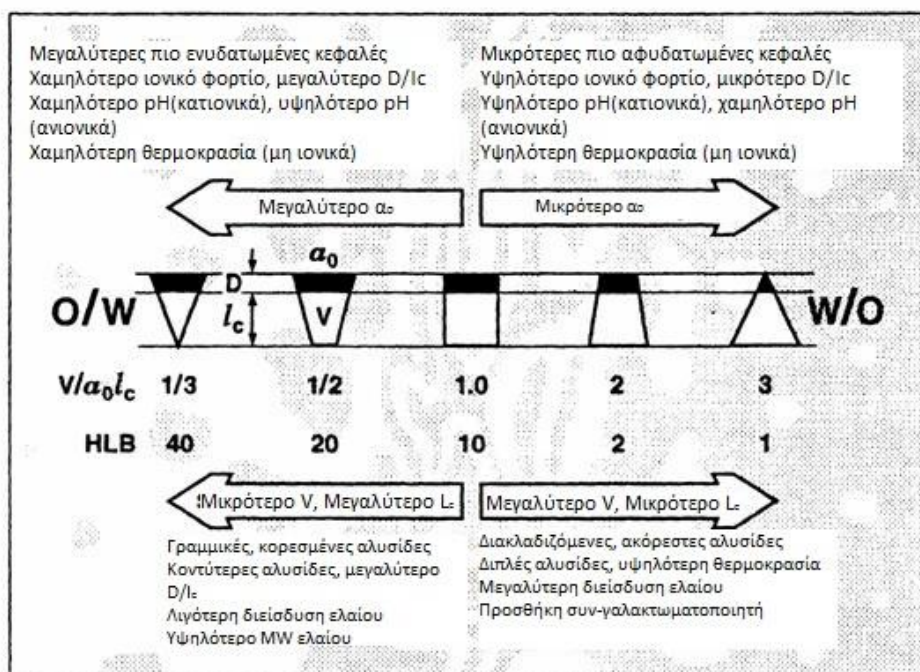
Σχήμα 7: Η επίδραση του packing parameter στο σχήμα του επιφανειοδραστικού και οι δομές που δημιουργούνται για την κάθε τιμή του [58]

2.2.4. Θεωρία HLB

Μια ακόμα θεωρία που συνδέει τη μοριακή δομή με τη διεπιφάνεια και την καμπυλότητα της είναι θεωρία HLB, η υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία. Γενικά εκφράζεται ως μια εμπειρική εξίσωση με βάση τις σχετικές αναλογίες των υδρόφοβων και υδρόφιλων ομάδων εντός του μορίου. Η έννοια εισήχθη για πρώτη φορά από τον Griffin [59], ο οποίος χαρακτήρισε έναν αριθμό επιφανειοδραστικών ενώσεων, και δημιούργησε μια εμπειρική

εξίσωση για τους μη ιονικούς αλκύλοπολυγλυκόλικους αιθέρες με βάση την επιφανειοδραστική χημική τους σύνθεση [60]:

Για ασυνεχείς δομές, δηλαδή, με μηδέν καμπυλότητα, δείχθηκε ότι η $HLB \approx 10$ [61]. Επομένως οι w/o μορφές μικρογαλακτωμάτων σχηματίζονται όταν $HLB < 10$, και τα o/w μικρογαλακτώματα όταν το $HLB > 10$. Το HLB και το packing parameter περιγράφουν την ίδια βασική έννοια, αν και το τελευταίο είναι πιο αντιπροσωπευτικό για τα μικρογαλακτώματα. Η επίδραση της γεωμετρίας επιφανειοδραστικού και του συστήματος συνθήκες σχετικά με τους αριθμούς HLB και η παράμετρος συσκευασία απεικονίζεται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Επίδραση της μοριακής γεωμετρίας και των συνθηκών του συστήματος στον packing parameter και στην τιμή HLB [61]

2.3. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων

Ο κύριος παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη παρασκευή μικρογαλακτωμάτων κυρίως για οφθαλμική χορήγηση είναι η σωστή επιλογή των συστατικών που θα το απαρτίζουν. Αυτή η ενότητα περιγράφει τις προδιαγραφές και τους περιορισμούς για τα διάφορα συστατικά ενός μικρογαλακτώματος. Επιπλέον στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα έκδοχα.

2.3.1. Το επιφανειοδραστικό

Το επιφανειοδραστικό έχει έναν εξέχοντα ρόλο στη δημιουργία των μικρογαλακτωμάτων. Όπως έχει προαναφερθεί από τη φύση του κρίνεται τόσο ο τύπος του γαλακτώματος (ο/w ή w/o) όσο και η δημιουργία νάνο, μικρο ή μακρογαλακτώματος. Ενώ η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού στα μακρογαλακτώματα μπορεί να αποτελέσει ακόμα και 0,1% κατά βάρος, για την παρασκευή ενός μικρογαλακτώματος απαιτείται πολύ μεγαλύτερο ποσοστό, λόγω της απαιτούμενης μεγάλης διεπιφάνειας μεταξύ της υδατικής και ελαιώδους φάσης [49]. Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση επιφανειοδραστικού μπορεί να οδηγήσει σε οφθαλμική τοξικότητα. Αυτός είναι και ο λόγος, που προτιμάται η μείωση της ποσότητας του επιφανειοδραστικού και η επιλογή της μη αυθόρμητης δημιουργίας του μικρογαλακτώματος όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3.5 [37].

Τα ιονικά επιφανειοδραστικά είναι γενικά πάρα πολύ τοξικά για να χρησιμοποιηθούν για αυτή την εφαρμογή. Ως εκ τούτου, προτιμώνται οι μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες [62]. Τα επιφανειοδραστικά αυτά έχουν καλή διαλυτότητα στο νερό και καλή οφθαλμική ανεκτικότητα. Επιπλέον για τη βελτιστοποίηση των ρεολογικών ιδιοτήτων του μικρογαλακτώματος προτιμώνται επιφανειοδραστικά με ακόρεστους δεσμούς στην αλειφατική τους αλυσίδα [37]. Συνεπώς με βάση τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε επιφανειοδραστικού (ιζώδες, τιμή HLB κλπ.) και λαμβάνοντας υπόψιν το είδους γαλακτώματος (ο/w ή w/o και μικρο/νάνο/μακρο) επιλέγεται και το καταλληλότερο.

2.3.2. Το συν-επιφανειοδραστικό

Οι συν-επιφανειοδραστικές ουσίες έχουν τρεις κύριες λειτουργίες [37]:

- i. παρέχουν ακόμα χαμηλότερη διεπιφανειακή τάση η οποία απαιτείται για το σχηματισμό των μικρογαλακτωμάτων και τη θερμοδυναμική σταθερότητα τους.
- ii. μπορούν να τροποποιήσουν την καμπυλότητα της επιφάνειας διεπαφής λόγω των άπολων ομάδων τους [49],
- iii. ενεργούν επί της ρευστότητας της διεπιφανειακής μεμβράνης. Εάν το φιλμ της διεπιφάνειας είναι πολύ άκαμπτο, δημιουργείται μία ιξώδης μάζα που τα χαρακτηριστικά της μοιάζουν περισσότερο με γέλη παρά με μικρογαλάκτωμα. Το συν-επιφανειοδραστικό παρέχει πρόσθετη ρευστότητα και έχει ισοδύναμη δράση με αυτή ενός διακλαδισμένου επιφανειοδραστικού.

Οι συν-επιφανειοδραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται συνήθως αποτελούνται από μικρά μόρια, τα οποία είναι γενικά αλκοόλες με χαμηλό μοριακό βάρος και γλυκόλες με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας τους να κυμαίνεται από C₂ μέχρι C₁₀ [37].

2.3.3. Η λιπαρή φάση

Η επιλογή της ελαιώδους φάσης (η οποία είναι και η εσωτερική φάση του γαλακτώματος στην μελέτη αυτή) είναι σημαντική, διότι από αυτήν κρίνεται τόσο η ύπαρξη του μικρογαλακτώματος όσο και η διαλυτοποίηση του φαρμάκου. Ένα οποιοδήποτε έλαιο δεν είναι απαραίτητο ότι θα πληροί και τις δύο προϋποθέσεις. Έλαια με υπερβολικά μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων είναι ακατάλληλα για τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων. Όσο μικρότερη είναι η αλυσίδα, τόσο βαθύτερη είναι η διείδυση της οργανικής φάσης στην διεπιφανειακή μεμβράνη και τόσο μεγαλύτερο το εύρος ύπαρξης του μικρογαλακτώματος. Ωστόσο, η ικανότητα διαλυτοποίησης των οργανικών ενώσεων αυξάνει με το μήκος της αλυσίδας [37].

Πολικά έλαια, όπως τα Long και Medium Chain Triglycerides (LCT, MCT) προτιμώνται των μη πολικών ελαίων, λόγω της καλύτερης διαλυτότητας των φαρμάκων σε αυτά.

Επιπλέον, η λιπαρή φάση δεν πρέπει να είναι πολύ πολική, διότι θα εμποδίσει το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος. Τα MCT συχνά προτιμώνται από τα LCT επειδή επιτρέπουν τη διάλυση των μεγάλων συγκεντρώσεων λιπόφιλων φαρμάκων και είναι πιο υδατοδιαλυτά.

Δύο ακόμα σημαντικές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψιν στην επιλογή της λιπαρής φάσης είναι η οφθαλμική ανεκτικότητα και ο βαθμός καθαρότητας τους. Δεν είναι πολλά τα έλαια που δεν δημιουργούν οφθαλμικό ερεθισμό κατά την εφαρμογή τους ακόμα και με την μορφή μικρογαλακτώματος. Επίσης για την αποφυγή οποιασδήποτε μόλυνσης με δυνητικά ερεθιστικές ουσίες είναι σημαντικός ο μέγιστος βαθμός καθαρότητας τους. Η τελική συγκέντρωση της ελαιώδους φάσης στα οφθαλμικά γαλακτώματα είναι πλέον ευρέως αποδεκτή σε ποσοστό 5% (w / w) ή ακόμα χαμηλότερο και το ιξώδες της μεταξύ 2 και 3 cP [63].

2.3.4. Η υδατική φάση

Η υδατική φάση συνήθως περιέχει διάφορα πρόσθετα, όπως ρυθμιστικούς, αντιβακτηριακούς και ισοτονικούς παράγοντες. Όπως έχει προαναφερθεί η αλατότητα της υδατικής φάσης επηρεάζει τα διαγράμματα φάσης του μικρογαλακτώματος όταν το επιφανειοδραστικό είναι ιονικό και μειώνει τη θερμοκρασία αναστροφής φάσης (PIT) των μη ιονικών επιφανειοδραστικών ουσιών. Η παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων είναι πολύ ευαίσθητη στη θερμοκρασία, εάν η PIT είναι κοντά στις συνθήκες παραγωγής. Η ρύθμιση του αρχικού pH στο 7-8 είναι επίσης σημαντική για να ελαχιστοποιηθεί η υδρόλυση των φωσφολιπιδίων και των τριγλυκεριδίων σε λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να μειώσουν το pH του μικρογαλακτώματος.

Τα συντηρητικά τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως σε σκευάσματα οφθαλμικών σταγόνων πολλές φορές δεν μπορούν να ενσωματωθούν σε μικρογαλακτώματα. Βασική προϋπόθεση που πρέπει να πληρείται για τη χρήση κάποιου συντηρητικού είναι να μην αλληλεπιδρά με τις επιφανειοδραστικές ουσίες με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκου, το οποίο έχει προφανώς μειωμένη αντιβακτηριδιακή δράση. Επιπλέον η μείωση της

δράσης πολλών συντηρητικών οφείλεται και στην απορρόφηση τους από τα νανοσταγονίδια της εσωτερικής φάσης [64].

2.3.5. Διαδικασίες παρασκευής

Η παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων απαιτεί τον προσδιορισμό της περιοχής ύπαρξης του μικρογαλακτώματος ο οποίος γίνεται με την οπτική παρατήρηση διαφόρων μιγμάτων επιφανειοδραστικού, ελαιώδους και υδατικής φάσης και την καταγραφή και αποτύπωση των συγκεντρώσεων τους σε ένα διάγραμμα φάσεων. Οι δύο τεχνικές που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία είναι [37]:

- i. η " ακριβής " διαδικασία με αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση
- ii. η διαδικασία η οποία βασίζεται στην προσφορά ενέργειας

Αυθόρμητη γαλακτωματοποίηση

Λόγω του αυθόρμητου σχηματισμού των μικρογαλακτωμάτων, είναι εφικτή η παρασκευή τους σε ένα και μόνο βήμα με την ανάμιξη των συστατικών του. Η σειρά της προσθήκης των συστατικών δεν θεωρείται κρίσιμος παράγοντας για την παρασκευή του, αλλά μπορεί να επηρεάσει το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η ισορροπία. Αυτός ο χρόνος θα αυξηθεί εάν το συν-επιφανειοδραστικό προστεθεί στην οργανική φάση, η μεγαλύτερη διαλυτότητα του σε αυτή τη φάση θα αποτρέψει τη διάχυση στην υδατική φάση.

Γαλακτωματοποίηση με την προσφορά ενέργειας

Στη περίπτωση αυτή τα μικρογαλακτώματα δεν παραλαμβάνονται αυθόρμητα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στις περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η μείωση του ποσοστού του επιφανειοδραστικού. Η δημιουργία του γαλακτώματος γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά δημιουργείται το πρωτεύον γαλάκτωμα με την ισχυρή ανάδευση της λιπαρής φάσης, του επιφανειοδραστικού και μέρους της υδατικής. Στη συνέχεια το πρωτεύον γαλάκτωμα αραιώνεται με την υπόλοιπη υδατική φάση.

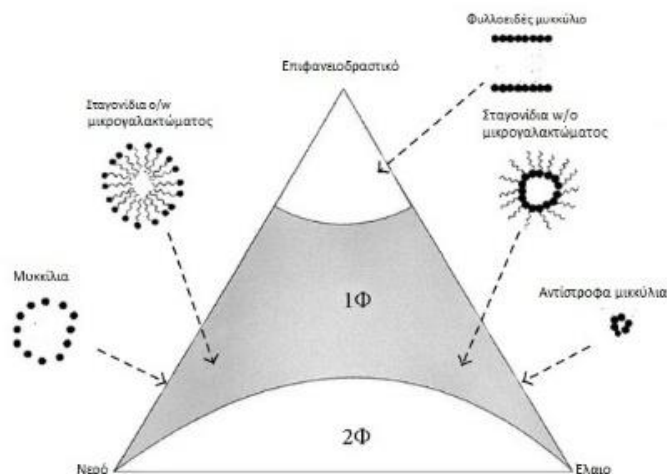
Πίνακας 6: Έκδοχα που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό οφθαλμικών γαλακτωμάτων [63]

Επιφανειοδραστικά	Έλαια	Διάφορα
Polysorbate 80 (Tween 80)	Sesame oil	a-Tocopherol
Tyloxapol	Castor oil	Glycerol
Poloxamer 188	Paraffin light	Xylitol
Kolliphor HS 15 (Polyoxyl 40 stearate)	Paraffin oil	Sorbitol
Octoxynol-40	Soya oil	Mannitol
Brij 97	Lanolin	Thiomersal
Phospholipids (Lipoid)	Vaseline	EDTA
Transcutol P	Corn oil	Methyl paraben
Cremophor RH 40	Medium chain triglycerides (MCT)	Propyl paraben
Poloxamer 407	Cottonseed oil	
Miranol C ₂ M and MHT	Safflower oil	
Cholesterol	Medium chain monoglycerides	
Vitamin E-TPGS	Glycerin monostearate	

2.3.6. Διαγράμματα Φάσης

Τα διαγράμματα φάσεων απεικονίζουν τα όρια των διαφορετικών φάσεων του μικρογαλακτώματος ως συνάρτηση των συστατικών του. Σε πολλές περιπτώσεις λόγω της παρουσίας περισσότερων από τρία συστατικά, ο ένας από τους τρεις άξονες αντιπροσωπεύει μια σταθερή αναλογία των δύο συστατικών (συνήθως το μίγμα επιφανειοδραστικού και συν-επιφανειοδραστικού), ενώ οι υπόλοιποι δύο άξονες την ελαιώδη και την υδατική φάση. Τότε διάγραμμα αυτό ονομάζεται ψευδο-τριαδικό διάγραμμα φάσης. Στα (ψεύδο)-τριαδικά διαγράμματα απεικονίζονται όλες οι φάσεις ενός μικρογαλακτώματος: υγρή κρυσταλλική, μικκύλια, o/w, w/o, ακόμα και μακρογαλακτώματα.

Η κατασκευή αυτών των διαγραμμάτων φάσεων μπορεί να γίνει με απλή οπτική παρατήρηση ή με μικροσκοπία πολωμένου φωτός δειγμάτων γνωστής σύνθεσης. Αγωγιμότητα, ιξώδες ή άλλες φυσικές παράμετροι μπορούν επίσης να χαρτογραφηθούν στα διαγράμματα φάσεων. Η κατασκευή τους πραγματοποιείται με τη μέθοδο της τιτλοδότησης. Το έλαιο και το μίγμα των επιφανειοδραστικών αναμιγνύονται σε προκαθορισμένες αναλογίες και το μίγμα τιτλοδοτείται αργά με την υδατική φάση. Μετά από κάθε προσθήκη, το σύστημα ελέγχεται και καταγράφεται η διαύγεια του και η αναλογία του κάθε συστατικού υπολογίζεται και σημειώνεται. Στη συνέχεια με τις διάφορες αναλογίες στις οποίες μπορεί να σχηματίζεται μικρογαλακτώμα σχεδιάζεται το (ψευδο)-τριαδικό διάγραμμα φάσεων [42] [51]. Στο Σχήμα 9 απεικονίζεται ένα υποθετικό τριαδικό διάγραμμα φάσεων ενός συστήματος ελαίου / επιφανειοδραστικού / νερού με τονισμένες τις περιοχές του μικρογαλακτώματος και του γαλακτώματος. Εντός του διαγράμματος υπάρχουν οι περιοχές όπου σχηματίζονται οι ακόλουθες μορφές: συμβατικά μικκύλια, αντίστροφα μικκύλια, w/o μικρογαλακτώματα και μικρογαλακτώματα ελαίου-σε-νερό σχηματίζονται μαζί με τα ασυνεχούς μικρογαλακτώματα.



Σχήμα 9: Παράδειγμα τριαδικού διαγράμματος φάσεων [51]

3. Πειραματικός Σχεδιασμός

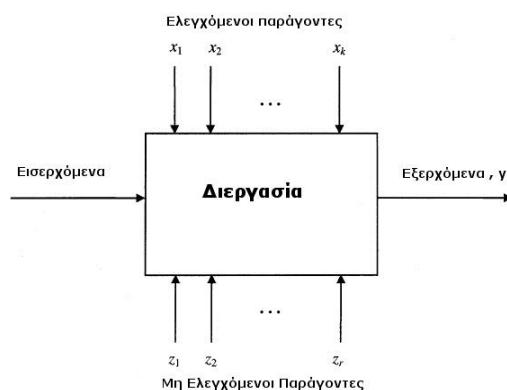
3.1. Ορισμοί

Κατά την ανάπτυξη μιας φαρμακευτικής συνταγής, προϊόντος ή διεργασίας, το αποτέλεσμα σπανίως είναι γνωστό *a priori*. Η επίλυση των εκάστοτε προβλημάτων και η αποσαφήνιση εγειρόμενων ερωτημάτων καθιστά αναγκαία την διεξαγωγή πειραμάτων με την βοήθεια της βιβλιογραφίας, της εμπειρίας και του επιστημονικού θεωρητικού υποβάθρου του ερευνητή.

Ο Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments, DOE) ορίζεται ως η μεθοδολογία διεξαγωγής και οργάνωσης πειραμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε να αποκτηθεί ο μέγιστος όγκος πληροφορίας με το μικρότερο δυνατό αριθμό πειραμάτων [65] [66]. Εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υπάρχουσα γνώση στο συγκεκριμένο πεδίο της επιστήμης και την διαθέσιμη τεχνολογία για τη διεξαγωγή των μετρήσεων [66].

Για τη πληρέστερη κατανόηση του πειραματικού σχεδιασμού απαιτείται η εξοικείωση με ορισμένους απλούς όρους οι οποίοι και παρατίθενται στη συνέχεια.

- **Διεργασία (Process):** ορίζεται ως ένας συνδυασμός ανθρώπων, μεθόδων, εξοπλισμού, υλικών, μετρήσεων και περιβαλλοντικών συνθηκών οι οποίες αλληλεπιδρούν παράλληλα ώστε να παραχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα [67].



Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση της Διεργασίας

- **Πειραματικός Σχεδιασμός (experiment design)** [68]: είναι η διευθέτηση του τρόπου διεξαγωγής ενός πειράματος και η επιλογή των επιπέδων ενός ή περισσότερων παραγόντων ή των συνδυασμών αυτών που θα συμπεριληφθούν στο πείραμα.
- **Πειραματική δοκιμή (experimental run)** [65]: είναι μία σειρά δοκιμασιών οι οποίες εκτελούνται υπό καθορισμένες συνθήκες και καταλήγουν σε ένα μοναδικό δεδομένο των μετρούμενων αποκρίσεων.
- **Δοκιμή (test)** [65]: είναι η διαδικασία της εξέτασης της ισχύος μίας υπόθεσης. Προσανατολίζεται στον έλεγχο της συμμόρφωσης για παράδειγμα με τις προδιαγραφές.
- **Σχεδιαστικός χώρος (design space)** [65]: καθορίζεται από τα επίπεδα των παραγόντων και αποτελεί το χώρο εντός του οποίου πραγματοποιούνται οι πειραματικές δοκιμές.
- **Παράγοντας ή Ανεξάρτητη μεταβλητή (factor or independent variable)** [65]: είναι η ελεγχόμενη ή μη μεταβλητή η οποία μπορεί να είναι ποσοτική ή ποιοτική και της οποίας η επίδραση μελετάται επί της απόκρισης. Ως ποιοτική χαρακτηρίζεται η μεταβλητή εκείνη που μπορεί να λάβει μόνο διακριτές τιμές ενώ ποσοτική, είναι η μεταβλητή εκείνη που μπορεί να λάβει αριθμητικές τιμές (συνεχείς ή διακριτές).
- **Επίπεδο Παράγοντα (factor level)**: είναι οι διάφορες τιμές που μπορεί να λάβει ένας παράγοντας στα πειράματα.
- **Απόκριση (response)** [67]: είναι το υπό μελέτη χαρακτηριστικό ποιότητας ή αλλιώς η μετρούμενη εξερχόμενη μεταβλητή μίας διεργασίας ή ενός πειράματος (εξαρτημένη μεταβλητή). Η επιλογή της απόκρισης ή των αποκρίσεων κατά το σχεδιασμό ενός πειράματος είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το γενικό σκοπό της μελέτης.
- **Επίδραση (effect) και Αλληλεπίδραση (interaction)**: επίδραση ονομάζεται το μέγεθος της αλλαγής μίας απόκρισης λόγω της μεταβολής των επιπέδων των υπό μελέτη παραγόντων. Ως κύρια επίδραση ορίζεται αυτή που έχει ο κάθε παράγοντας

ξεχωριστά στα διάφορα επίπεδα του [67]. Ο όρος αλληλεπίδραση χρησιμοποιείται στη περίπτωση εκείνη στην οποία η επίδραση ενός παράγοντα στην απόκριση δεν είναι γραμμική δηλαδή δεν εμφανίζει αναλογία με τη μεταβολή των επιπέδων του. Το φαινόμενο της αλληλεπίδρασης μπορεί να είναι συνεργικό ή ανταγωνιστικό ανάλογα με το εάν το αποτέλεσμα στη μεταβολή της απόκρισης είναι επιθυμητό ή μη [69].

- **Μαθηματικό μοντέλο (mathematical model)** [65]: είναι η έκφραση η οποία ορίζει την εξάρτηση της εξαρτημένης μεταβλητής (απόκριση) από τις ανεξάρτητες μεταβλητές (απόκριση).

3.2. Πλεονεκτήματα Πειραματικού Σχεδιασμού

Οι φαρμακευτικές διεργασίες αποτελούν σύνθετα συστήματα τα οποία επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες. Η εφαρμογή του Πειραματικού Σχεδιασμού στη φάση της ανάπτυξης των προϊόντων και κατά το σχεδιασμό των διεργασιών παραγωγής αποτελεί το κλειδί για την Ποιότητα καθώς μεγιστοποιεί την αποκτηθείσα πληροφορία που λαμβάνεται με ένα μικρό αριθμό πειραμάτων και μέσω της εφαρμογής των τεχνικών του, αναγνωρίζει τη βέλτιστη συνταγή και τις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής των συγκεκριμένων διεργασιών.

Ένας παραγοντικός σχεδιασμός είναι πιο αποτελεσματικός για το καθορισμό των επιδράσεων ενός αριθμού παραγόντων σε μία απόκριση σε σχέση με τη παραδοσιακή προσέγγιση του ενός παράγοντα τη φορά (one factor at a time approach) για μία σειρά από λόγους [70] [71] [66] [72]:

- Απαιτεί λιγότερους πόρους σε πειράματα, χρόνο, υλικά κλπ. σε σχέση με τον όγκο και την ακρίβεια της πληροφορίας που αποκτάται καθώς ο υπολογισμός των επιδράσεων των παραγόντων πραγματοποιείται με χρήση όλων των πειραμάτων σε αντίθεση με τη μέθοδο αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά στην οποία μία επίδραση υπολογίζεται από δύο πειράματα κάθε φορά. Επίσης, τα συμπεράσματα που εξάγονται δεν εξαρτώνται από τη σειρά εκτέλεσης των πειραμάτων.

- βοηθά στον καθορισμό των σημαντικών μεταβλητών οι οποίες και θα πρέπει να τεθούν υπό έλεγχο.
- βοηθά στην εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων στην απόκριση και επομένως την αποφυγή εσφαλμένων συμπερασμάτων.
- βοηθά στην ελαχιστοποίηση της αλληλοεπικάλυψης (confounding) ή αλλιώς ψευδωνυμίας (aliasing) των επιδράσεων που έχουν οι παράγοντες στην απόκριση.
- ο πειραματικός χώρος είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν της αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά και τα συμπεράσματα τα οποία εξάγονται έχουν ισχύ σε ένα εύρος συνδυασμών επιπέδων των άλλων παραγόντων του σχεδιασμού.
- παρέχει με τη χρήση γραφημάτων τη δυνατότητα απεικόνισης του τρόπου με τον οποίο συνδέονται οι μεταβλητές και τα επίπεδα αυτών τα οποία δίνουν το βέλτιστο προϊόν.

3.3. Στάδια Πειραματικού Σχεδιασμού

Η γενική προσέγγιση στο σχεδιασμό και διεξαγωγή του πειράματος, ονομάζεται σχεδιασμός ή στρατηγική του πειράματος (strategy of experimentation). Τα σπουδαιότερα βήματα που ακολουθούνται κατά τον σχεδιασμό ενός πειράματος είναι [73]:

- Περιγραφή του προβλήματος και του στόχου του πειράματος
- Ανάλυση και επεξεργασία των υπαρχόντων δεδομένων πάνω στο συγκεκριμένο θέμα
- Επιλογή των παραγόντων που θα μελετηθούν, καθώς και των επιπέδων τους
- Επιλογή της εξαρτημένης μεταβλητής (απόκριση του πειράματος)
- Επιλογή του κατάλληλου τύπου σχεδιασμού
- Διεξαγωγή του πειράματος
- Ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος
- Τελικά συμπεράσματα

3.4. Είδη Πειραματικού Σχεδιασμού

Οι σχεδιασμοί χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

- i. Σχεδιασμοί διεργασιών (Process designs)
- ii. Σχεδιασμοί συνταγών (Mixture designs)

3.4.1. Σχεδιασμοί διεργασιών

Πειράματα Διαχωρισμού Παραγόντων (Screening)

Τα πειράματα αυτά πραγματοποιούνται στα πρώτα στάδια του πειραματισμού και έχουν ως κύριο σκοπό τον διαχωρισμό και την επιλογή των παραγόντων εκείνων που επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά την απόκριση. Επίσης, κατά το στάδιο αυτό διερευνάται και ο τρόπος (θετικά ή αρνητικά) με τον οποίο οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες επηρεάζουν την απόκριση [72].

Μελέτες Επίδρασεων των Παραγόντων (Factor effect studies)

Κατά τις μελέτες αυτές, διερευνάται η επίδραση των παραγόντων οι οποίοι έχουν κριθεί ως στατιστικά σημαντικοί. Η αποτελεσματικότητα των παραγοντικών σχεδιασμών στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων βασίζεται στη χρήση της στατιστικής (στο σχεδιασμό και την ανάλυση των πειραμάτων) αλλά και στη δυνατότητα της εκτίμησης της αλληλεπίδρασης των παραγόντων στην απόκριση την οποία [72].

Μελέτες Βελτιστοποίησης (Optimization)

Κατά τις μελέτες βελτιστοποίησης επιθυμείται η εύρεση του συνδυασμού και του εύρους των επιπέδων των παραγόντων που έχει ως αποτέλεσμα τη βέλτιστη τιμή της απόκρισης. Γίνεται κυρίως χρήση της μεθοδολογίας επιφανειών απόκρισης (RSM). Η μεθοδολογία αυτή στοχεύει στη δημιουργία επιφανειών απόκρισης και στην περιγραφή αυτών με τη χρήση κυρίως δευτεροβάθμιων ή και τριτοβάθμιων μοντέλων [72].

3.4.2. Σχεδιασμός μιγμάτων

Ο σχεδιασμός μιγμάτων χρησιμοποιείται όταν ο σχεδιασμός αφορά ένα μίγμα συστατικών με αποτέλεσμα να υφίστανται περιορισμοί στις τιμές που μπορούν να λάβουν τα ποσοστά των συστατικών. Την εφαρμογή των σχεδιασμών μειγμάτων διέπουν δύο βασικοί περιορισμοί [72]:

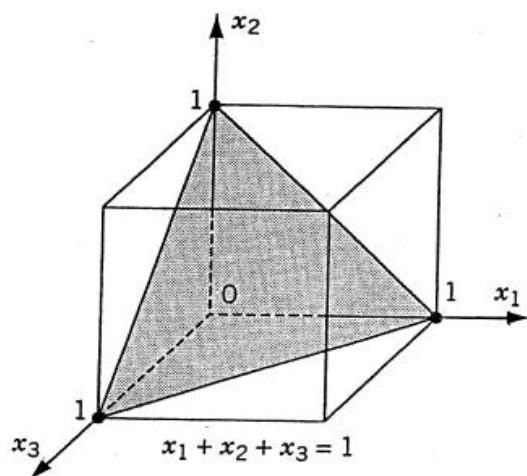
1. Το κλάσμα κάθε συστατικού του μείγματος μπορεί να λάβει μόνο θετικές τιμές οι οποίες δεν υπερβαίνουν τη μονάδα.
2. Το άθροισμα των αναλογιών των συστατικών του μείγματος ισούται με τη μονάδα.

Συγκεκριμένα, ας θεωρήσουμε ένα σύστημα με m αριθμό συστατικών, $x_1, x_2, \dots, x_m$, τότε σύμφωνα με τις αρχές που έχουν τεθεί θα ισχύουν τα ακόλουθα [74]:

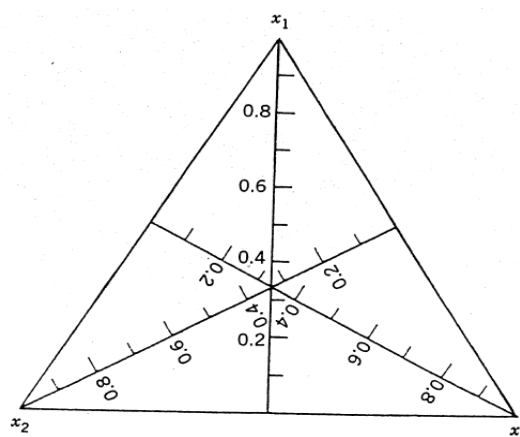
- i. $0 \leq x_i \leq 1$ όπου x_i οποιοσδήποτε αριθμός μεταξύ 1 και m
- ii. $x_1 + x_2 + \dots + x_m = 1$

Ο τελευταίος περιορισμός αίρει την ανεξαρτησία των διαφόρων παραγόντων, επηρεάζοντας τόσο την περιοχή σχεδιασμού όσο και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ο συνήθης τρόπος περιγραφής των μιγμάτων τριών συστατικών επιτυγχάνεται μέσω δισδιάστατων σχημάτων με τρεις κορυφές ή αλλιώς των τριαδικών διαγραμμάτων. Ας υποθέσουμε ένα μίγμα που συνίσταται από 3 συστατικά A , B , και C . Δεδομένου των αρχών που πρέπει να πληρούν τα μίγματα, η πειραματική περιοχή αντιστοιχεί σε ισόπλευρο τρίγωνο, οι κορυφές του οποίου αντιπροσωπεύουν αμιγώς το κάθε συστατικό, δηλαδή $(0,1,0)$, $(1,0,0)$, $(0,0,1)$. Κάθε πειραματικό σημείο εντός του τριγώνου αντιπροσωπεύει μίγμα με συγκεκριμένες ιδιότητες [65].



Σχήμα 11: Simplex σχεδιασμός



Σχήμα 12: Τριαδικό διάγραμμα

3.4.1. Περιορισμένα μίγματα (Constrained mixtures)

Οι επιπλέον περιορισμοί που υπεισέρχονται στις αναλογίες των συστατικών στο σύνολο σχεδόν των φαρμακευτικών συνταγών, επηρεάζουν άμεσα τον σχεδιασμό των μιγμάτων καθιστώντας ανεπαρκή τα τυποποιημένα μοντέλα. Η ικανοποίηση ανώτερων, ή κατώτερων ή συγχρόνως ανώτερων και κατώτερων ορίων δημιουργεί στους ακόλουθους σχεδιασμούς.

Μίγματα συστατικών με κατώτερα όρια [65]

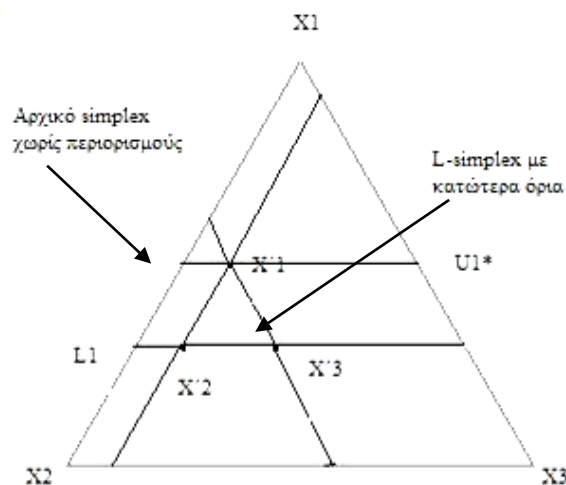
Για λόγους απλούστευσης θεωρούμε ένα μίγμα τριών συστατικών, με την παραδοχή ότι κάθε συστατικό i πρέπει να ικανοποιεί ένα κατώτατο όριο L_i συγκέντρωσης.

$$0 \leq L_i \leq x_i \leq 1$$

Τα φανερά κατώτερα όρια με τη σειρά τους οδηγούν στον υπολογισμό των υποφαινόμενων ανώτερων ορίων U_i^* :

$$0 \leq L_i \leq x_i \leq U_i^* \leq 1$$

Στην περίπτωση που η περιοχή σχεδιασμού υπάρχει εντός αυτών των ορίων, αυτά χαρακτηρίζονται *συνεχή*. Ωστόσο, αν το άθροισμα των κατώτερων ορίων υπερβαίνει την μονάδα, η πειραματική περιοχή δεν υπάρχει και τα όρια L_i πλέον είναι *ασυνεχή*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιβολή αποκλειστικά κατώτερων ορίων σε συνδυασμό με υπαρκτή πειραματική ζώνη οδηγεί πάντα σε simplex σχεδιασμό.



Σχήμα 13: Μίγμα με συνεχή κατώτερα όρια

Η νέα πειραματική περιοχή, αποτέλεσμα των κατώτερων περιορισμών, εξακολουθεί να είναι simplex επιτρέποντας την μεταχείριση των μιγμάτων ως μίγματα ψευδοσυστατικών, τα οποία δεν είναι τίποτα περισσότερο από κωδικοποιημένες τιμές των αναλογιών τους. Οι επιτρεπτές τιμές των ψευδοσυστατικών κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1, με το 0 να αντιστοιχεί στην κατώτατη συγκέντρωση και το 1 στην ανώτατη και υπολογίζονται ως εξής [75]:

$$X_i^* = \frac{x_i - L_i}{1 - L}$$

Όπου $L = \sum_{i=1}^q L_i < 1$, το άθροισμα όλων των κατώτερων ορίων

x_i η πραγματική τιμή του i συστατικού και

L_i το πραγματικό κατώτατο όριο

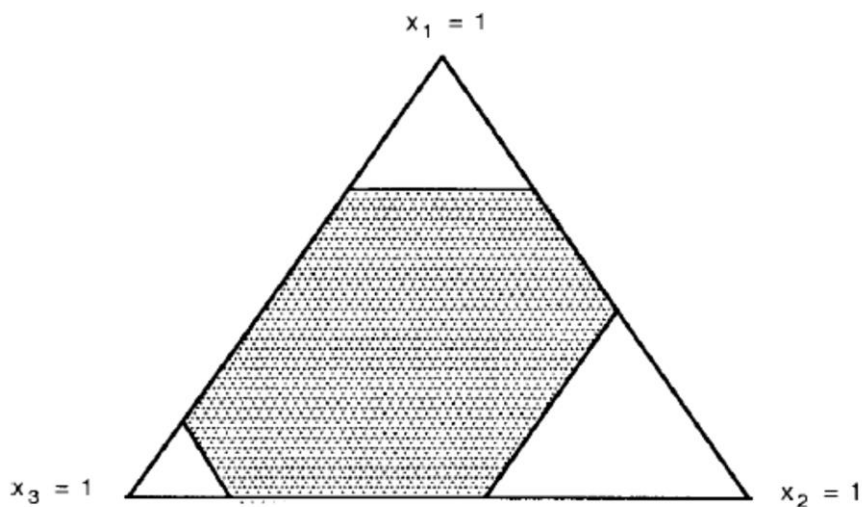
Θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση των ψευδοσυστατικών διευκολύνει τόσο την κατασκευή του σχεδιασμού όσο και την προσαρμογή του μοντέλου στην περιοχή του ενδιαφέροντος μας.

Σχεδιασμοί μιγμάτων με ανώτερα όρια

Όπως και στην περίπτωση των κατώτερων ορίων έτσι και σε αυτήν την περίπτωση η περιοχή σχεδιασμού είναι και πάλι simplex. Επιπρόσθετα, η επεξεργασία αυτών των σχεδιασμών επιτυγχάνεται με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή με τη χρήση ψευδοσυστατικών.

Σχεδιασμοί μιγμάτων με ανώτερα και κατώτερα όρια

Η ικανοποίηση συγχρόνως ανώτερων και κατώτερων ορίων στις συγκεντρώσεις των συστατικών του μίγματος, καθιστά αδύνατη την κατασκευή των τυποποιημένων σχεδιασμών, ως αποτέλεσμα της απουσίας simplex πειραματικής περιοχής.



Σχήμα: Πειραματική περιοχή μίγματος με ανώτερα και κατώτερα όρια [76]

Η προσέγγιση αυτών των προβλημάτων επιτυγχάνεται με την χρήση ειδικών αλγορίθμων, ικανών να δημιουργήσουν τον βέλτιστο σχεδιασμό και να προσαρμόσουν το κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο. Σημαντικός εκπρόσωπος αυτών των σχεδιασμών είναι ο I optimal

σχεδιασμός, χαρακτηριστικό του οποίου αποτελεί η ελαχιστοποίηση της διασποράς (variance) των εκτιμητών των συντελεστών στο μοντέλο, συμβάλλοντας στον ακριβέστερο προσδιορισμό αυτών.

4. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η παρασκευή και ο *in vitro* χαρακτηρισμός γαλακτωμάτων κυκλοσπορίνης Α καταλλήλων για οφθαλμική χρήση με τη μέθοδο του πειραματικού σχεδιασμού.

Αναλυτικότερα επιχειρήθηκε η παρασκευή γαλακτωμάτων από εγκεκριμένα και ασφαλή για τον οφθαλμό έκδοχα. Τα γαλακτώματα αυτά περιείχαν την απαιτούμενη για την αντιμετώπιση της ξηροφθαλμίας ποσότητα της κυκλοσπορίνης διαλυμένη στην εσωτερική τους φάση.

Ένα επιπλέον σημαντικό χαρακτηριστικό είναι το μικρό μέγεθος σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης των γαλακτωμάτων. Γαλακτώματα με διάμετρο σταγονιδίων μικρότερη των 100nm χαρακτηρίζονται ως μικρο/νανο γαλακτώματα και έχουν την ιδιότητα να είναι διάφανα ή ημιδιάφανα. Η ιδιότητα αυτή αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για ένα οφθαλμικό σκεύασμα αφού η κυκλοσπορίνη βρίσκεται διαλυμένη στα σταγονίδια αυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β

ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 1. Εξοπλισμός, Λογισμικά και Υλικά**
- 2. Μέθοδοι**

1. Εξοπλισμός, Λογισμικά και Υλικά

1.1. Εξοπλισμός

Για την δημιουργία και την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- **Ηλεκτρονικοί ζυγοί:** Mettler Toledo AT 261 Delta Range® (Mettler, Switzerland) και Kern & Sohn GmbH ABJ
- **Υδατόλουτρο υπερήχων:** Branson Sonicator 5200 (Branson, U.S.A.)
- **Θερμαντική πλάκα με μαγνητική ανάδευση:** Thermolyne Nuova II |Stiplate (Barnstead, Thermolyne, U.S.A)
- **Συσκευή διήθησης υπό κενό:** Millipore
- **Φίλτρα για τη συσκευή διήθησης υπό κενό Millipore:** Durapore® Membrane filters, 0.45 µm HV
- **Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), που περιλαμβάνει:**

Αντλία υψηλής πίεσεως Spectra System P1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)

Αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler) Spectra System AS1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)

Στήλη, C18 Waters-Spherisorb ODS2 5.0µm, 250 × 4.6 mm (Bischoff, Germany)

Φούρνος Στήλης: Eldex CH-150

Ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού Spectra System 2000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)

Μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)

Ηλεκτρονικό υπολογιστή (Thermo Quest, Inc., U.S.A.)

- **Συσκευή μέτρησης pH:** ORION model 410 A
- **Κλίβανος:** WT binder (Germany)
- **Περιστρεφόμενος δίσκος:** Fischer Scientific, U.S.A.
- **Φυγόκεντρος:** Sigma 202 MK (Sigma, Germany)

- **Τροποποιημένα κύτταρα Franz:** (Crown Glass, Somerville, U.S.A.), με εμβαδόν ανοίγματος 0.636 cm^2 και όγκο διαμερίσματος δέκτη 6.275 ml .
- **Μεμβράνη κυτταρίνης** Visking® Dialysis Tubing 44120 (Serva Electrophoresis, Germany)
- **Θερμορρυθμιστής:** Edmund Bühler 7400 (Tübingen, Germany).
- **Υδατόλουτρο:** Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany).
- **Μαγνητική πλάκα ανάδευσης:** Cimarec 3 (Thermolyne, U.S.A).
- **Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων:** Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyzer 3000 (Malvern Instruments Ltd, UK)
- **Ομογενοποιητής:** T18 digital ULTRA TURRAX (IKA®, Germany)

1.2. Λογισμικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα λογισμικά:

- Design Expert 8.0.0, Stat-Ease Inc. (Minneapolis, US.)
- Microsoft excel 2013, (Microsoft, US)
- Chromquest®, Version 5.1 (ThermoQuest, U.K.)
- Chemix School Version 3.6

1.3. Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- Η Κυκλοσπορίνη Α (Sigma-Aldrich, USA, LOT No: P500092) ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας Rafarm S.A.
- Medium Chain Triglycerides (Kertus ICSA, Greece, LOT No: L6000093A-14-03)
- Castor Oil (Καστορέλαιο) (M. Roumboulakis S.A., Greece, LOT No: 0125624)
- Corn Oil (Καλαμποκέλαιο) refined (Greece, LOT No: 133797)
- Paraffin Oil (Παραφινέλαιο) pharmaceutical grade, (Chemco, Greece, LOT No: S125131364)

- Kolliphor HS 15 (BASF, Germany, LOT No: 48328768E0).
- Polysorbate 80 (Fagron, Netherlands, LOT No: 102254)
- Pemulen TR-2, Lubrizol (Chemix, Greece, LOT No: 0101668225)
- Glycerine (Γλυκερίνη) refined min. 99.8% (Chemco, Greece, LOT No: S100131655)
- Sodium Chloride 0.9% (Στείρο μη πυρετογόνο παρεντερικό διάλυμα) (Demo, Greece, LOT No: 1506743)
- Water for injection (Στείρος διαλύτης χωρίς πυρετογόνα για παρεντερική χρήση) (Demo, Greece, LOT No: 1404160)
- Νερό, βαθμού καθαρότητας HPLC (Carlo Erba Reagents, France)
- Acetonitrile, βαθμού Far UV HPLC (Fisher Scientific, UK).
- Sodium Dodecyl Sulfate
- Absolute Ethanol καθαρότητας HPLC (Panreac Quimica SA, Spain)

2. Μέθοδοι

2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

2.1.1. Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης

Για την ανάλυση των προτύπων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τροποποίηση δημοσιευμένης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Οι συνθήκες ανάλυσης συνοψίζονται στον Πίνακα 7

Πίνακας 7: Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης

Στατική φάση (στήλη)	C18 Waters-Spherisorb ODS2 5.0μm, 250×4.6 mm
Κινητή φάση	Ακετονιτρίλιο – Νερό σε αναλογία 70:30
Ροή	1.5 ml/min
Μήκος κύματος ανιχνευτή	210 nm
Όγκος έγχυσης (loop)	50 μl
Θερμοκρασία	60 °C

2.1.2. Παρασκευή κινητής φάσης

Για την παρασκευή της κινητής φάσης ογκομετρούνται οι διαλύτες ακετονιτρίλιο και νερό καθαρότητας HPLC. Ακολουθεί καλή ανακίνηση και τοποθέτηση στο λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η απαέρωση της κινητής φάσης. Τέλος, η κινητή φάση διηθείται υπό κενό στη συσκευή Millipore χρησιμοποιώντας φίλτρα Durapore® Membrane filters, 0.45 μm HV για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων.

2.1.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης

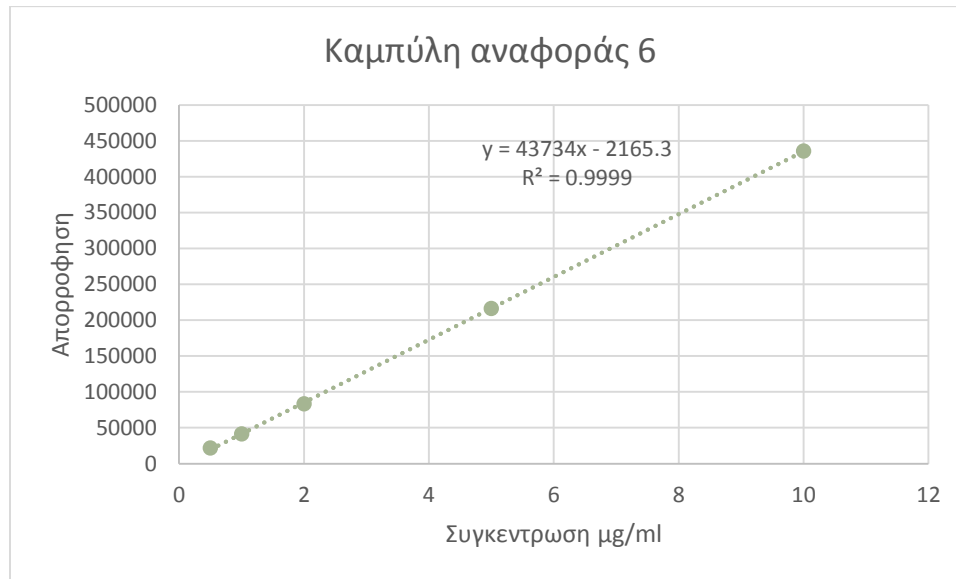
Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης αρχικά παρασκευάζεται το μητρικό διάλυμα (stock solution) συγκέντρωσης 50 μg/ml. Η παρασκευή έγινε σύμφωνα με τη Αμερικανική Φαρμακοποιία [77], ζυγίστηκαν 2.5 mg κυκλοσπορίνης και αραιώση με διάλυμα ακετονιτρίλιου – νερού 1:1 σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Ακολουθεί

ανάδευση και υπερήχηση για 10 min για την πλήρη διάλυση του στερεού. Τέλος, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0.5, 1, 2, 5 και 10 $\mu\text{g/ml}$ με αραιώση του μητρικού διαλύματος σε κινητή φάση.

2.1.4. Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου ανάλυσης

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης, τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα κυκλοσπορίνης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα αποτελέσματα (εμβαδά) που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης και υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2).

Έλεγχοι γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα εντός κινητής φάσης πριν από τη διεξαγωγή πειραμάτων προσδιορισμού διαλυτότητας κορεσμού και ποσοτικού προσδιορισμού των γαλακτωμάτων καθώς και εντός του διαλύματος υποδοχέα πριν από τη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων αποδέσμευσης. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται μια ενδεικτική καμπύλη αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$.



Γράφημα 1: Καμπύλη Αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης

2.2. Πειράματα Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού

Η διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης προσδιορίστηκε στα έλαια paraffin oil, castor oil, corn oil και MCT. Επιπλέον προσδιορίστηκε και η διαλυτότητα κορεσμού σε υδατικό διάλυμα NaCl 0.9% (φυσιολογικός ορός), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν υγρό πλήρωσης του διαμερίσματος δέκτη στα κύτταρα διάχυσης Franz (διάλυμα υποδοχέα). Παρασκευάστηκαν υπέρκορα διαλύματα φορέα-κυκλοσπορίνης, τα οποία παρέμειναν υπό ανάδευση για 24 ώρες σε περιστρεφόμενο δίσκο, εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 30°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των υπέρκορων διαλυμάτων με ταχύτητα 4000 rpm/min για 10 λεπτά στους 20°C. Από το υπερκείμενο λήφθηκε όγκος 250μl και αραιώθηκε με κινητή φάση στα 25 ml. Τα έλαια paraffin oil και corn oil είναι μη αναμίξιμα με την κινητή φάση, συνεπώς μετά την αραιώση το διφασικό σύστημα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για 24h ώστε να εκχυλιστεί όλη η ποσότητα της κυκλοσπορίνης. Στα έλαια όπου η συγκέντρωση της κυκλοσπορίνης ήταν μεγάλη (MCT, castor oil και corn oil) απαιτήθηκε και δεύτερη αραιώση 1:200. Κάθε υπέρκορο διάλυμα φορέα παρασκευάστηκε εις τριπλούν.

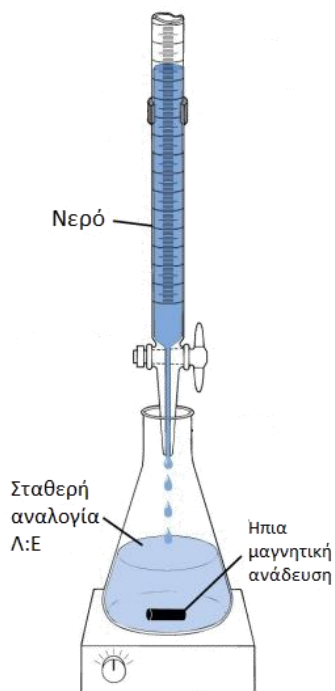
Τα διαλύματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Για την ανάλυση των ελαίων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα κυκλοσπορίνης σε

κινητή φάση. Επιπλέον έγινε ο έλεγχος για πιθανές παρεμποδίσεις στις χρωματογραφικές κορυφές ανάλυσης για το διάλυμα του υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού της κυκλοσπορίνης στο διάλυμα του υποδοχέα έγινε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης αραιωμένα με διάλυμα αυτό.

2.3. Προκαταρκτικά Πειράματα Κατασκευής Διαγραμμάτων Φάσης

Τα προκαταρκτικά πειράματα κατασκευής τριαδικών διαγραμμάτων φάσης πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστούν τα καταλληλότερα συστατικά και το εύρος των συγκεντρώσεων τους για το σχηματισμό μικρογαλακτώματος. Για την επιλογή των συστατικών λήφθηκαν υπόψιν βάσει βιβλιογραφίας [37] οι εξής παράμετροι: καλή οφθαλμική ανεκτικότητα, χαμηλή τοξικότητα και εμπορική διαθεσιμότητα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε, όπου ήταν εφικτό, το τριαδικό διάγραμμα φάσης ώστε να καθοριστεί η έκταση των περιοχών του μικρογαλακτώματος.

Τα διαγράμματα φάσης κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την μέθοδο της τιτλοδότησης (Σχήμα 14) όπως περιγράφεται από την βιβλιογραφία [42] [51] [78]. Το έλαιο (Λ) και το επιφανειοδραστικό (Ε) αναμινύονται στις εξής αναλογίες: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9. Στη συνέχεια το μίγμα τιτλοδοτείται αργά με την υδατική φάση υπό μέτρια μαγνητική ανάδευση. Μετά από κάθε προσθήκη, το σύστημα ελέγχεται και καταγράφεται η διαύγεια του. Τέλος για την διευγή περιοχή υπολογίζεται και σημειώνεται η αναλογία του κάθε συστατικού, με βάση τις οποίες σχεδιάζεται το τριαδικό διάγραμμα φάσεων. Να σημειωθεί ότι κατά το σχεδιασμό της περιοχής του μικρογαλακτώματος δεν έγινε διάκριση μεταξύ o/w και w/o μικρογαλακτωμάτων.



Σχήμα 14: Διάταξη τιτλοδότησης

2.4. Πειραματικός Σχεδιασμός

Η επιλογή των συστατικών του υπό εξέταση μίγματος βασίστηκε στα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, τα οποία έδωσαν σαφείς ενδείξεις για την επίδραση των διαφόρων παραγόντων στη διαλυτότητα της κυκλοσπορίνης καθώς και στην επιφάνεια του μικρογαλακτώματος.

2.4.1. Επιλογή παραγόντων και ορίων πειραματικού σχεδιασμού

Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν η % αναλογία των ελαίων Castor Oil και MCT καθώς και του επιφανειοδραστικού Kolliphor HS 15.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η λιπαρή φάση ενός γαλακτώματος αποτελεί συνήθως ποσοστό μικρότερο του 5% ενώ το ανώτερο όριο του επιφανειοδραστικού κυμαίνεται 5-6%. Επιπλέον από τα προκαταρκτικά πειράματα για την παρασκευή ενός μικρογαλακτώματος προκύπτει ότι το ελάχιστο ποσοστό του επιφανειοδραστικού

Kolliphor θα πρέπει να είναι στο 2%. Με βάση τα παραπάνω οι περιορισμοί που τέθηκαν για τις αναλογίες των συστατικών είναι οι εξής :

$$0.5\% \leq \text{MCT (A)} \leq 2.5\%$$

$$0.5\% \leq \text{Castor Oil (B)} \leq 2.5\%$$

$$2\% \leq \text{Kolliphor HS15 (C)} \leq 6\% \quad \text{και}$$

$A + B + C = 7\%$ το υπόλοιπο 93% του μίγματος αποτελούνταν από νερό (92.95%) και κυκλοσπορίνη (0.05%).

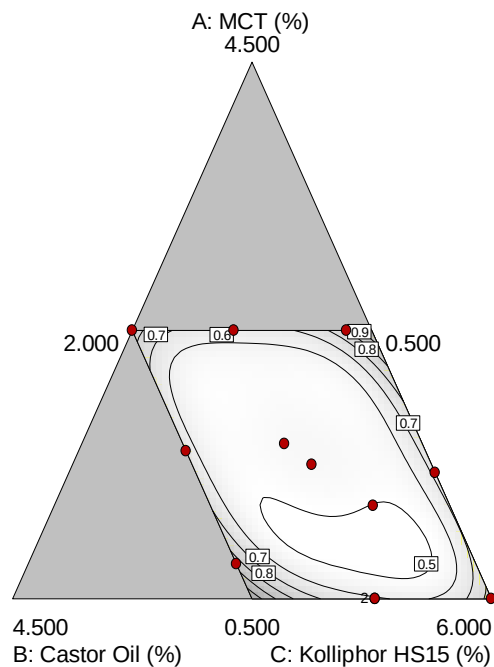
Βάσει των παραπάνω περιορισμών επιλέχθηκε I – optimal πειραματικός σχεδιασμός για μίγματα. Αρχικά παρασκευάστηκαν οι ακραίες συνταγές του πειραματικού σχεδιασμού για ελεγχθεί ότι σχηματίζεται γαλάκτωμα με τις οριακές τιμές των παραγόντων. Στη συνέχεια εκτελέστηκαν δώδεκα δοκιμές, ώστε να αποτιμηθεί η επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών στις αποκρίσεις. Στο σύνολο των πειραμάτων περιλαμβάνεται και μία επανάληψη συνταγής για την εκτίμηση του lack of fit (συνταγές 7 και 9). Τα επίπεδα των τριών παραγόντων, δηλαδή οι συστάσεις των γαλακτωμάτων που παρασκευάστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 ενώ ο πειραματικός χώρος που μελετήθηκε απεικονίζεται στο Σχήμα 2.

Πίνακας 8: Σύσταση συνταγών σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό

Run	MCT (%)	Castor Oil (%)	Kolliphor (%)
1	1.6	2.5	2.9
2	1.5	1.5	4.0
3	1.2	1.1	4.7
4	1.7	1.7	3.7
5	2.5	1.7	2.8
6	1.4	0.5	5.1
7	0.5	1.5	5.0
8	0.8	2.5	3.7
9	0.5	1.5	5.0
10	2.5	0.7	3.8
11	2.5	2.5	2.0
12	0.5	0.5	6.0

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
Std Error of Design
● Design Points
Std Error Shading
1.5
0.5

X1 = A: MCT
X2 = B: Castor Oil
X3 = C: Kolliphor HS15



Σχήμα 15: Γραφική απεικόνιση πειραματικού χώρου

2.4.2. Επιλογή αποκρίσεων πειραματικού σχεδιασμού

Ως απόκριση του σχεδιασμού επιλέχθηκε η υδροδυναμική διάμετρος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης των γαλακτωμάτων (Dh σε nm). Η απόκριση αυτή σχετίζεται άμεσα με την παρουσία ή όχι μικρογαλακτώματος και συνεπώς με την σταθερότητα του συστήματος.

Επιπλέον επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί ένα in vitro πείραμα διάχυσης της κυκλοσπορίνης μέσω τεχνητής μεμβράνης κυτταρίνης στόχος του οποίου ήταν η συγκριτική μελέτη της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης από τα γαλακτώματα. Η απόκριση του πειραματικού σχεδιασμού που επιλέχθηκε να μελετηθεί ήταν η ποσότητα της κυκλοσπορίνης που διαπερνούσε την μεμβράνη ανά μονάδα επιφανείας (Q σε $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) στις 6h από την έναρξη του πειράματος.

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) από το πρόγραμμα πειραματικού σχεδιασμού Design Expert.

2.5. Παρασκευή Γαλακτωμάτων

Η παρασκευή των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκε με τροποποίηση βιβλιογραφικής μεθόδου [79]. Αρχικά ζυγίζονται και αναμιγνύονται τα δύο έλαια. Στη συνέχεια προστίθεται η προζυγισμένη κυκλοσπορίνη και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυσή της. Ακολουθεί η προσθήκη του Kolliphor HS15 και ανάδευση ώστε να προκύψει ομοιογενές μίγμα. Καθώς πρόκειται για ημιστερεό επιφανειοδραστικό στις περιπτώσεις που βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση η ανάμιξη γίνεται με τη βοήθεια σπάτουλας. Το παραπάνω μίγμα αποτελεί την λιπαρή φάση. Στη συνέχεια προστίθενται αργά και υπό ισχυρή ανάδευση 20mL water for injection. Το πρωτογενές γαλάκτωμα που προκύπτει αφήνεται να αναδευτεί για 10min, ακολούθως αραιώνεται με την υπόλοιπη υδατική φάση. Τέλος, μετρήθηκε και ρυθμίστηκε το pH των τελικών γαλακτωμάτων στο 7.0 ± 0.5 . Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε γυάλινους αποστειρωμένους περιέκτες. Επιπλέον των γαλακτωμάτων κυκλοσπορίνης παρασκευάσθηκε με την ίδια μέθοδο τυφλό γαλάκτωμα σύστασης ίδιας με το δείγμα 7/9.

2.6. Παρασκευή Πρότυπου Γαλακτώματος

Το πρότυπο γαλάκτωμα δημιουργήθηκε για να αποτελέσει μέτρο σύγκρισης για τα προς μελέτη δείγματα. Το πρότυπο γαλάκτωμα που επιλέχθηκε ήταν μία εργαστηριακή παραγωγή του εμπορικού προϊόντος Restasis®. Η παρασκευή του ως προς τη σύσταση βασίστηκε τις πατέντες των S. Ding *et al* [22] και A. Acheampong *et al* [23] (Πίνακας 9) ενώ η διαδικασία παραγωγής του βασίστηκε στα αποτελέσματα της μελέτης των Rahman *et al* [79] με κάποιες τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευή 50g γαλακτώματος ζυγίστηκαν 0,025g κυκλοσπορίνης τα οποία διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε 0,625g castor oil. Στη συνέχεια προστέθηκε η glycerin και το 1/3 της συνολικής ποσότητας του επιφανειοδραστικού. Το παραπάνω μίγμα αναδεύτηκε μέχρι να γίνει ομοιογενές και αποτελεί τη λιπαρή φάση του γαλακτώματος. Η προζυγισμένη ποσότητα του Pemulen TR- 2 διαλύθηκε υπό ανάδευση σε 47.7gr ύδατος. 10gr του παραπάνω διαλύματος προστέθηκαν αργά στο σύνολο της λιπαρής φάσης και το σύστημα ομογενοποιήθηκε στις 3000rpm για 5min. Από την ομογενοποίηση προέκυψε το πρωτογενές γαλάκτωμα. Τα υπόλοιπα 37.7gr ύδατος αναμείχθηκαν με τα εναπομείναντα 2/3 του επιφανειοδραστικού και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH στο 7.1. Τέλος προστέθηκε το παραπάνω μίγμα στο πρωτογενές γαλάκτωμα και το σύστημα ομογενοποιήθηκε στις 3000rpm για 10min. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψε λευκό γαλάκτωμα μετρίου ιξώδους.

Πίνακας 9: Σύσταση πρότυπου γαλακτώματος (Restasis) [23]

Συστατικό	Ποσότητα (%w/w)	Ρόλος
CsA	0.05	Δραστική Ουσία
Castor oil	1.25	Λιπαρή (εσωτερική φάση)
Polysorbate 80	1.00	Γαλακτωματοποιητής
Pemulen	0.05	Σταθεροποιητής γαλακτώματος
Glycerine	2.20	Παράγοντας τονικότητας
pH	7.2 - 7.6	-

2.7. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυκλοσπορίνης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κυκλοσπορίνης στα δείγματα ελήφθησαν από κάθε δείγμα 300μL με αυτόματη πιπέτα και αραιώθηκαν με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 50mL. Τα διαλύματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με την μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2.1. Επιπλέον των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός στο πρότυπο γαλάκτωμα (εργαστηριακό Restasis). Τέλος για τον έλεγχο πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές ανάλυσης από τα έκδοχα των γαλακτωμάτων, αναλύθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες και το τυφλό δείγμα.

2.8. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων και ζ-Δυναμικού

Η μέτρηση της κατανομής μεγέθους των σταγονιδίων εσωτερικής φάσης και του ζ-δυναμικού πραγματοποιήθηκε με το όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων

2.8.1. Αρχή λειτουργίας

Σωματίδια μεγέθους από 1-5000nm μπορούν να μετρηθούν με τη μέθοδο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (photon correlation spectroscopy – PCS). Ένα από τα

χαρακτηριστικά των σωματιδίων είναι ότι βρίσκονται σε συνεχή τυχαία θερμική κίνηση (κίνηση Brown). Αυτή η κίνηση έχει ως αποτέλεσμα η ένταση του σκεδαζόμενου από τα σωματίδια φωτός να σχηματίζει ένα μοντέλο κινούμενου στίγματος. Αυτή η κινητικότητα ανιχνεύεται ως αλλαγή της έντασης σε σχέση με το χρόνο, από έναν ανιχνευτή και έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Τα μεγάλα σωματίδια κινούνται πιο αργά από τα μικρά και συνεπώς ο ρυθμός της διακύμανσης του σκεδαζόμενου φωτός είναι πιο βραδύς. Η φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων χρησιμοποιεί το ρυθμό μεταβολής των διακυμάνσεων του φωτός για να προσδιορίσει την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων που προκαλούν το σκεδασμό του φωτός.

Στο όργανο αυτό η παραγωγή της δέσμης του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται από λυχνία He-Ne και το μήκος κύματος του φωτός είναι 633nm. Η ακτινοβολία προσπίπτει στα σωματίδια (π.χ. στα σταγονίδια της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος), σκεδάζεται και στη συνέχεια, τα σκεδαζόμενα φωτόνια ανιχνεύονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Στο λογισμικό του οργάνου υπάρχει πρόγραμμα αλγορίθμων που επεξεργάζεται τις μεταβολές της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και καταλήγει στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται στο δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μαθηματική ανάλυση, η οποία συνίσταται από την ISO 13321 διεθνή μέθοδο, προκύπτει και ο μέσος όρος των μεγεθών. Κατά τις μετρήσεις αυτές το μέγεθος ορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων – σταγονιδίων, ενώ ως δείκτης διασποράς το εύρος κατανομής.

Το ζ-δυναμικό των σωματιδίων που μετρά το όργανο είναι το ζ-δυναμικό της επιφάνειας κάλυψης του σωματιδίου που δημιουργείται μεταξύ του φορτίου του σωματιδίου και του μέσου, και όχι το φορτίο επιφανείας του σωματιδίου.

2.8.2. Εφαρμογή του δείγματος

Το δείγμα αραιώνεται από 10 μέχρι και 60 φορές με H₂O HPLC καθαρότητας (pH 5.6-5.7) διηθημένο (από φίλτρο Millipore με διάμετρο πόρων 200nm) και μεταφέρεται σε κυψελίδα όγκου 3ml μιας χρήσης από πολυστυρένιο. Στη συνέχεια τοποθετείται στην ειδική

υποδοχή του οργάνου, η οποία κλείνει με καπάκι ώστε να μην διαχέεται το σκεδαζόμενο φως. Τα δείγματα σκεδάστηκαν (633nm) υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25°C .

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού πραγματοποιείται με ένεση του δείγματος με σταθερό ρυθμό στην ειδική υποδοχή του οργάνου, προς αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων που θα εμπόδιζαν τη σωστή μέτρηση του ζ-δυναμικού. Η ειδική αυτή υποδοχή οδηγεί το γαλάκτωμα στην εσωτερική κυψελίδα του οργάνου όπου και γίνεται υπό τις ίδιες συνθήκες με παραπάνω η μέτρηση του ζ-δυναμικού. Τα αποτελέσματα και των δύο μετρήσεων αναλύθηκαν με τη μέθοδο Contin του πακέτου λογισμικού Malvern.

2.9. Μελέτη Σταθερότητας

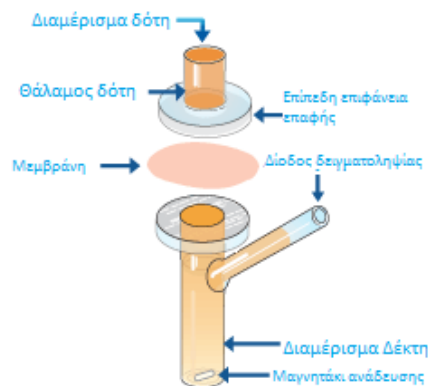
Στη διεθνή βιβλιογραφία προτείνεται πληθώρα μεθόδων αξιολόγησης της σταθερότητας των γαλακτωμάτων όπως η οπτική παρακολούθηση, το pH του γαλακτώματος, το ιζώδες, η πυκνότητα, το μέγεθος σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης, το ζ-δυναμικό [80].

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- i. Οπτική παρακολούθηση για 3 μήνες.
- ii. Προσδιορισμός του μεγέθους και της κατανομής των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος για 1 μήνα

2.10. In vitro πειράματα διάχυσης

Για την in vitro μελέτη της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης πραγματοποιήθηκε πείραμα διάχυσης. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Franz (Σχήμα 16) όγκου 6.275 ml και διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης 0.636 cm^2 .



Σχήμα 16: Τυπικό κύτταρο διάχυσης

2.10.1. Μεμβράνη

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τεχνητή μεμβράνη κυτταρίνης. Η μεμβράνη κόπηκε σε τεμάχια διαστάσεων περίπου 1.4 x 1.4 cm τα οποία εμβαπτίσθηκαν σε απιονισμένο νερό 100°C για 1min. Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε διάλυμα γλυκερίνης – νερού 1:1 εντός ψυγείου μέχρι την έναρξη των πειραμάτων.

2.10.2. Διαλύματα υποδοχέα

Τα διαλύματα υποδοχέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

- Διάλυμα NaCl 0.9% (εμπορικό σκεύασμα)
- Διάλυμα Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0.5%. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με την αραιώση 5gr SDS σε 1L ενέσιμο ύδωρ.
- Absolute Ethanol (εμπορικό σκεύασμα)

Οι παραπάνω διαλύτες τοποθετήθηκαν για 15 min σε λουτρό υπερήχων για να διασφαλιστεί η πλήρης απαέρωση τους.

2.10.3. Πείραμα διάχυσης

Τα τεμάχια της μεμβράνης τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμέρισμα-δέκτη του κυττάρου Franz και η διάταξη συγκρατήθηκε με μεταλλικό σφιγκτήρα. Για κάθε συνταγή

χρησιμοποιήθηκαν 3 κύτταρα. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα από το πλευρικό άνοιγμα δειγματοληψίας μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 32°C πάνω σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης και παρέμειναν εκεί για περίπου 9 ώρες. Η θερμοκρασία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της θερμοκρασίας της επιφάνειας του οφθαλμού. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια πιπέτας στο διαμέρισμα δότη κάθε κυττάρου 600μl από κάθε γαλάκτωμα.

Ακολούθησαν δειγματοληψίες στα χρονικά διαστήματα 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 και 9 ωρών. Σε κάθε δειγματοληψία αφαιρέθηκε με την βοήθεια σύριγγας 1.5mL διαλύματος υποδοχέα και αντικαταστάθηκε από νέα ποσότητα.

2.10.4. Χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων

Για την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης στο διάλυμα του κάθε υποδοχέα, ώστε να επιβεβαιωθεί η γραμμικότητα της μεθόδου. Επιπλέον έγινε ο έλεγχος για πιθανές παρεμποδίσεις στις χρωματογραφικές κορυφές ανάλυσης για το διάλυμα του κάθε υποδοχέα.

Στις περιπτώσεις όπου τα διαλύματα του υποδοχέα ήταν το 0.9% διάλυμα NaCl και το 0.5% διάλυμα SDS τα δείγματα αναλύθηκαν ανααίωτα. Όταν χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη ως διάλυμα υποδοχέα τα δείγματα αραιώθηκαν 1:1 με κινητή φάση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ

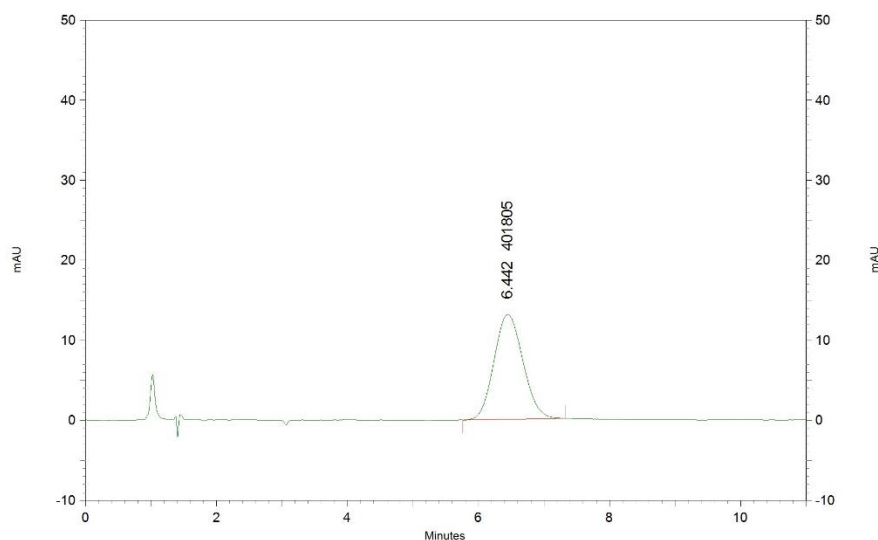
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
2. Διαλυτότητα Κορεσμού Κυκλοσπορίνης
3. Προκαταρτικά Πειράματα Κατασκευής Διαγραμμάτων Φάσης
4. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυκλοσπορίνης
5. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων Εσωτερικής Φάσης
και ζ-Δυναμικού
6. Μελέτη Σταθερότητας
7. In vitro Πειράματα Διάχυσης
8. Πειραματικός Σχεδιασμός

1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

1.1. Εμφάνιση χρωματογραφήματος

Η ανάλυση πρότυπου διαλύματος κυκλοσπορίνης συγκέντρωσης 10μg/ml εντός κινητής φάσης υπό τις χρωματογραφικές συνθήκες που περιγράφονται στην παράγραφο 2.1.1 του πειραματικού μέρους, έδωσε το χρωματογράφημα που απεικονίζεται παρακάτω. Ο χρόνος ανάσχεσης είναι στα ~ 6,17 min.

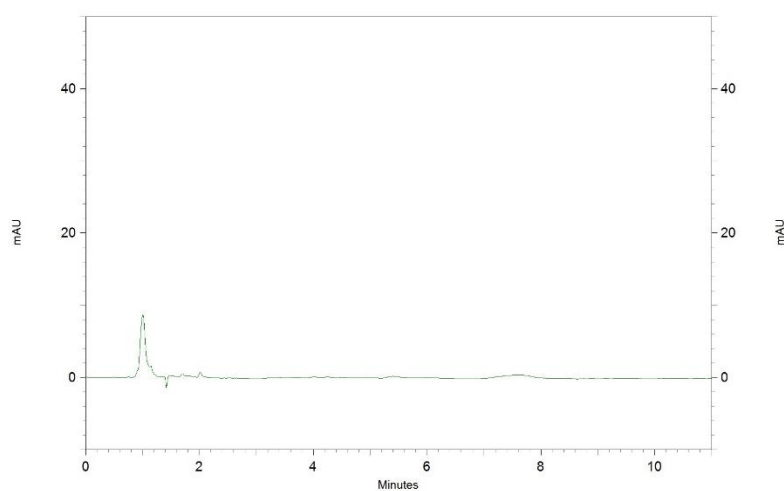


Σχήμα 17: Απεικόνιση χρωματογραφήματος προτύπου διαλύματος κυκλοσπορίνης 10μg/mL

1.2. Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές

Ο έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές πραγματοποιήθηκε τόσο για τα έκδοχα των γαλακτωμάτων όσο και για τα διαλύματα υποδοχέα του πειράματος αποδέσμευσης. Αποτελέσματα των αναλύσεων του τυφλού δείγματος έδειξαν ότι η παρουσία των εκδόχων του γαλακτώματος δεν επηρεάζει, ούτε παρεμποδίζει τη χρωματογραφική κορυφή της κυκλοσπορίνης (Σχήμα 18). Επιπλέον η ανάλυση των

δειγμάτων πρότυπου διαλύματος κυκλοσπορίνης στα διαλύματα των υποδοχέων διάλυμα NaCl 0.9% διάλυμα Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0.5% έδειξε ότι η χρωματογραφική κορυφή της κυκλοσπορίνης και πάλι δεν επηρεάζεται. Αντίθετα, στην περίπτωση της Absolut Ethanol κρίθηκε απαραίτητη η αραίωση των προτύπων και των δειγμάτων με κινητή φάση 1:1 καθότι ο διαλύτης αυτός παρέμβαινε στην εικόνα του χρωματογραφήματος.

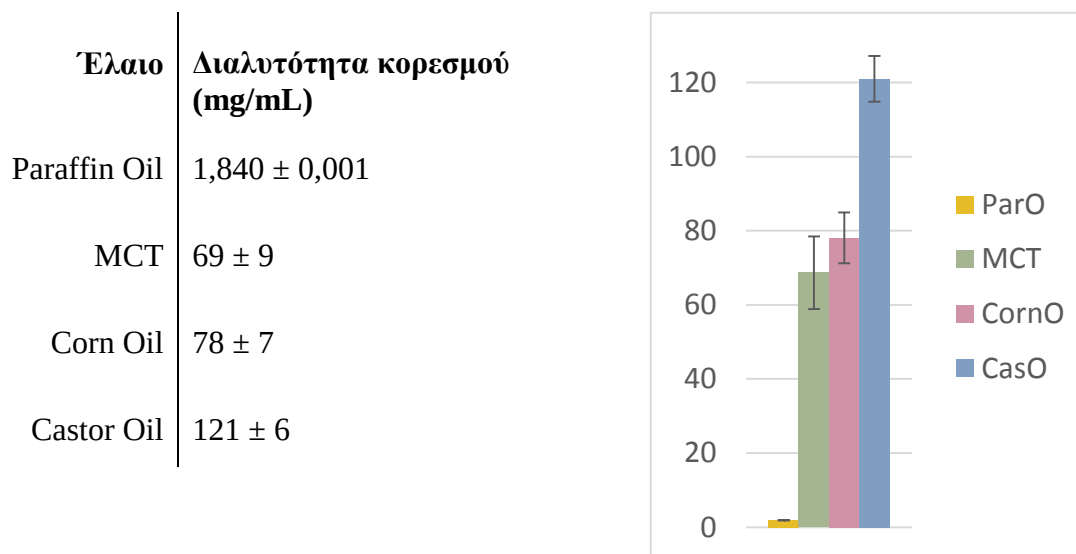


Σχήμα 18 Απεικόνιση χρωματογραφήματος τυφλού γαλακτώματος

2. Διαλυτότητα Κορεσμού Κυκλοσπορίνης

Από τα έλαια που προτείνονται στη βιβλιογραφία ως φορείς της κυκλοσπορίνης για την παρασκευή οφθαλμικών σκευασμάτων, επιλέχθηκαν εκείνα τα οποία εμφανίζουν την καλή οφθαλμική ανεκτικότητα, χαμηλή τοξικότητα και αποτελούν εγκεκριμένα έκδοχα εμπορικών σκευασμάτων. Η διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης προσδιορίστηκε λοιπόν για τα έλαια Paraffin Oil, Castor Oil, MCT και Corn Oil. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης στα διάφορα έλαια φορείς



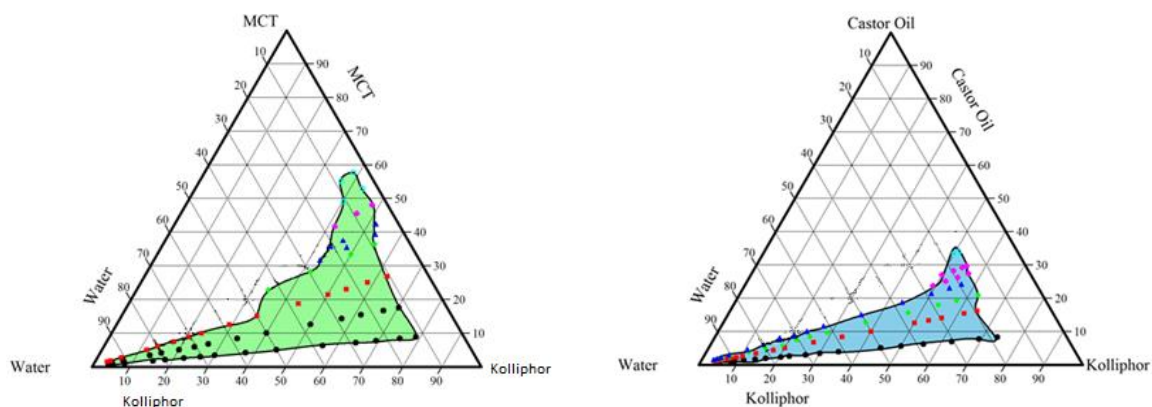
Γράφημα 2: Διαλυτότητα κορεσμού

Η επιθυμητή συγκέντρωση της κυκλοσπορίνης στο γαλάκτωμα είναι 0,05% w/w ενώ η μέγιστη περιεκτικότητα σε λιπαρή φάση 5%. Συνεπώς η διαλυτότητα της κυκλοσπορίνης στο έλαιο που θα επιλεγθεί πρέπει να είναι τουλάχιστον 10mg/mL. Από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνουμε ότι η κυκλοσπορίνη έχει διαλυτότητα κορεσμού στο Paraffin Oil μικρότερη από τα 10 mg/mL που απαιτούνται, επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εσωτερική φάση του γαλακτώματος. Στα υπόλοιπα τρία έλαια, MCT, Corn Oil και Castor Oil η διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης είναι ικανοποιητική επομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν την εσωτερική φάση του γαλακτώματος.

Επιπλέον προσδιορίστηκε η διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης στο διάλυμα υποδοχέα 0.9% NaCl στα 0.0207 ± 0.0004 $\mu\text{g/mL}$. Η τιμή αυτή επιβεβαιώνει τον χαρακτηρισμό της κυκλοσπορίνης ως εξαιρετικά δυσδιάλυτη ένωση σε υδατικούς φορείς.

3. Προκαταρκτικά Πειράματα Κατασκευής Διαγραμμάτων Φάσης

Για τον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων των συστατικών που απαιτούνται για το σχηματισμό ενός μικρογαλακτώματος κατασκευάστηκαν τριαδικά διαγράμματα φάσης με τη μέθοδο της τιτλοδότησης. Τα έλαια που επιλέχθηκαν για την κατασκευή των διαγραμμάτων αυτών ήταν αυτά στα οποία η κυκλοσπορίνη είχε ικανοποιητική διαλυτότητα κορεσμού. Τα επιφανειοδραστικά που δοκιμάστηκαν ήταν δύο μη ιονικά επιφανειοδραστικά εγκεκριμένα ως έκδοχα για οφθαλμική χρήση, το Kolliphor HS 15 και το Polysorbate 80. Στο *Γράφημα 3* παρατίθενται τα τριαδικά διαγράμματα φάσης για τα συστήματα MCT-Kolliphor HS 15-Νερό και Castor Oil-Kolliphor HS 15-Νερό. Η χρωματισμένη περιοχή αποτελείται από όλες τις αναλογίες των παραπάνω συστατικών από τις οποίες προκύπτει μικρογαλάκτωμα.

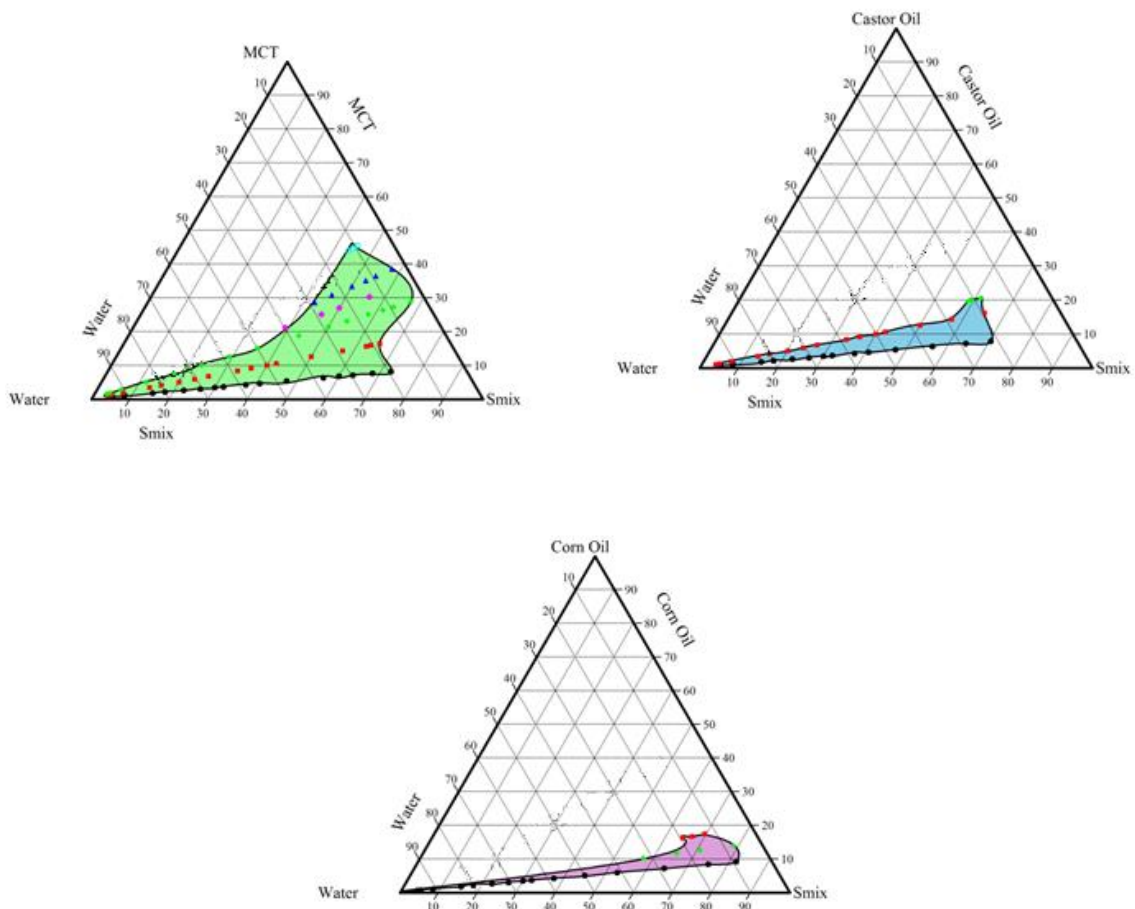


Γράφημα 3: Τριαδικά διαγράμματα φάσης για το σύστημα MCT-Kolliphor HS 15-Νερό (αριστερά) και το σύστημα Castor Oil-Kolliphor HS 15-Νερό (δεξιά)

Η κατασκευή τριαδικού διαγράμματος για το σύστημα Corn Oil-Kolliphor HS 15-Νερό δεν ήταν εφικτή καθότι καμία αναλογία των παραπάνω συστατικών δεν είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρογαλακτώματος. Επιχειρήθηκε λοιπόν η παρασκευή μικρογαλακτώματος με συστατικά το Corn Oil, Νερό και το Tween 80 σαν επιφανειοδραστικό. Από το παραπάνω σύστημα προέκυψε ένα μείγμα με μεγάλο ιξώδες,

συνεπώς κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη ενός συν-επιφανειοδραστικού ώστε να προσδώσει ρευστότητα τη διεπιφανειακή μεμβράνη και να μειώσει το ιξώδες του συστήματος.

Το συν-επιφανειοδραστικό που επιλέχθηκε ήταν η Glycerine, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει ρόλο συν-επιφανειοδραστικού για τα μικρογαλακτώματα [81] αλλά και ωσμωτικού παράγοντα για τα οφθαλμικά σκευάσματα [3]. Για την κατασκευή των νέων διαγραμμάτων φάσης χρησιμοποιήθηκε σαν πρώτο συστατικό το αντίστοιχο έλαιο, σαν δεύτερο το νερό ενώ το τρίτο συστατικό αποτελούνταν από μείγμα επιφανειοδραστικού – συν-επιφανειοδραστικού σε αναλογία 2:1 (Smix). (Γράφημα 4)



Γράφημα 4: Τριαδικό διάγραμμα φάσης για το σύστημα MCT-Smix-Νερό (πάνω αριστερά), Castor Oil- Smix –Νερό (πάνω δεξιά) και Corn Oil- Smix –Νερό (κάτω)

Από τα παραπάνω διαγράμματα συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη της Glycerine στο σύστημα έχει δύο επιδράσεις

- i. Μειώνει το ιξώδες του μείγματος. Αυτή η επίδραση καθιστά δυνατή τη παρασκευή μικρογαλακτώματος και κατασκευή διαγράμματος φάσης με Corn Oil, Tween 80 και Νερό.
- ii. Μειώνει την επιφάνεια του μικρογαλακτώματος. Συγκρίνοντας τις επιφάνειες των μικρογαλακτωμάτων πριν και μετά την προσθήκη γλυκερίνης στα συστήματα MCT-Kolliphor HS 15-Νερό και Castor Oil-Kolliphor HS 15-Νερό διαπιστώνουμε ότι η περιοχή των συνταγών από τις οποίες προκύπτει μικρογαλάκτωμα μικραίνει με την προσθήκη γλυκερίνης. Συνεπώς η παρουσία γλυκερίνης στα παραπάνω συστήματα δεν ευνοεί τον σχηματισμό μικρογαλακτώματος.

Από τα παραπάνω προκαταρκτικά πειράματα συμπεραίνουμε ότι η μεγαλύτερη επιφάνεια μικρογαλακτώματος προκύπτει από τα συστήματα MCT-Kolliphor HS 15-Νερό και Castor Oil-Kolliphor HS 15-Νερό. Επομένως σαν παράγοντες του πειραματικού σχεδιασμού επιλέγονται τα έλαια Castor Oil και MCT και το επιφανειοδραστικό Kolliphor.

4. Ποσοτικός Προσδιορισμός Κυκλοσπορίνης

Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των γαλακτωμάτων, όπως αυτός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ενότητα 2.7 του πειραματικού μέρους προέκυψαν τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού κυκλοσπορίνης

Δείγμα	Συγκέντρωση (mg/mL)	% w/w	πραγματική/θεωρητική τιμή (%)
1	0.504	0.050	100.7%
2	0.493	0.049	98.7%
3	0.493	0.049	98.6%
4	0.470	0.047	94.0%
5	0.468	0.047	93.6%
6	0.470	0.047	94.0%
7	0.494	0.049	98.7%
8	0.482	0.048	96.4%
9	0.469	0.047	93.8%
10	0.491	0.049	98.2%
11	0.482	0.048	96.4%
12	0.469	0.047	93.8%
Min	0.466	0.047	93.2%
Max	0.504	0.050	100.7%

Η συγκέντρωση της κυκλοσπορίνης κυμαινόταν μεταξύ 93.2 και 100.7 % της θεωρητικής τιμής. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Φαρμακοποιίας που ορίζουν τα αντίστοιχα όρια μεταξύ 90-110% [77]. Επομένως τα γαλακτώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περεταίρω μελέτη.

5. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων Εσωτερικής Φάσης και ζ-Δυναμικού

Οι μετρήσεις της κατανομής μεγέθους σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης και του ζ-δυναμικού των γαλακτωμάτων πραγματοποιήθηκαν 12h μετά την παρασκευή τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Μετρήσεις κατανομής μεγέθους σταγονιδίων και ζ-δυναμικού

Δείγμα	D _h (nm)	PD.I.	Z-pot (mV)
1	302.5 ± 6.0	0.487 ± 0.143	-3.3 ± 12.6
2	59.8 ± 1.2	0.248 ± 0.010	-11.7 ± 10.4
3	31.8 ± 0.8	0.091 ± 0.023	-7.7 ± 6.7
4	81.9 ± 1.6	0.306 ± 0.002	-5.1 ± 1.9
5	202.8 ± 5.0	0.303 ± 0.057	9.2 ± 2.1
6	27.9 ± 0.8	0.148 ± 0.013	-3.7 ± 1.8
7	31.1 ± 0.7	0.190 ± 0.007	-2.7 ± 1.6
8	126.6 ± 2.9	0.171 ± 0.040	-6.0 ± 1.2
9	28.6 ± 1.0	0.087 ± 0.029	2.3 ± 0.2
10	54.2 ± 1.7	0.113 ± 0.016	-3.7 ± 2.6
11	802.2 ± 16.8	1.000±0.000	5.7 ± 0.2
12	20.0 ± 0.4	0.294 ± 0.056	-3.4 ± 2.5
Min	20	0.087	-11.7
Max	802.2	1	9.2
Πρότυπο	965.8 ±109.3	0.822 ± 0.246	-11.4 ± 1.8

Επιπλέον τα παραπάνω γαλακτώματα με βάση το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής τους φάσης (D_h) μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες:

- i. **$D_h < 50\text{nm}$** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα δείγματα 12, 9, 7, 6 και 3. Αποτελούν μικρο/νάνο γαλακτώματα και χαρακτηριστικά τους είναι ο κατά κανόνα μικρός δείκτης πολυδιασποράς (Pd.i) και η διαφάνεια. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Τα δείγματα 12, 9, 7, 6 και 3 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας

- ii. **$50\text{ nm} < D_h < 100\text{nm}$** Τα δείγματα που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι τα 10, 2 και 4. Πρόκειται για ημιδιάφανα γαλακτώματα και η μέτρηση τους δείχνει ότι ανήκουν στην περιοχή των μικρο/νάνο γαλακτωμάτων. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: : Τα δείγματα 10, 2 και, 4 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας

- iii. **$D_h > 100\text{nm}$** Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα δείγματα 8, 5, 1 και 11. Όπως φαίνεται τόσο από το άσπρο τους χρώμα όσο και από το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής τους φάσης είναι όλα μακρογαλακτώματα. (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Τα δείγματα 8, 5, 1 και 11 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας

Τα δεδομένα των μετρήσεων της κατανομής μεγέθους σταγονιδίων χρησιμοποιήθηκαν ως το πρώτο response του πειραματικού σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα του σχεδιασμού αναλύονται στην ενότητα 8 των αποτελεσμάτων.

Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του ζ-δυναμικού δεν διέφεραν μεταξύ των γαλακτωμάτων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τιμές του ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από +30mV και μικρότερες από -30mV αποτελούν ένδειξη σταθερότητας του γαλακτώματος η οποία οφείλεται σε ηλεκτροστατικές απώσεις. Στην προκειμένη περίπτωση το ζ-δυναμικό έλαβε τιμές μεταξύ -11,7 και +9,2mV. Οι τιμές αυτές δικαιολογούνται από το γεγονός ότι το επιφανειοδραστικό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των γαλακτωμάτων ήταν μη ιονικό ενώ παράλληλα κανένα άλλο συστατικό δεν έφερε φορτίο. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι η σταθερότητα των γαλακτωμάτων οφείλεται σε στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις των μορίων.

6. Μελέτη Σταθερότητας

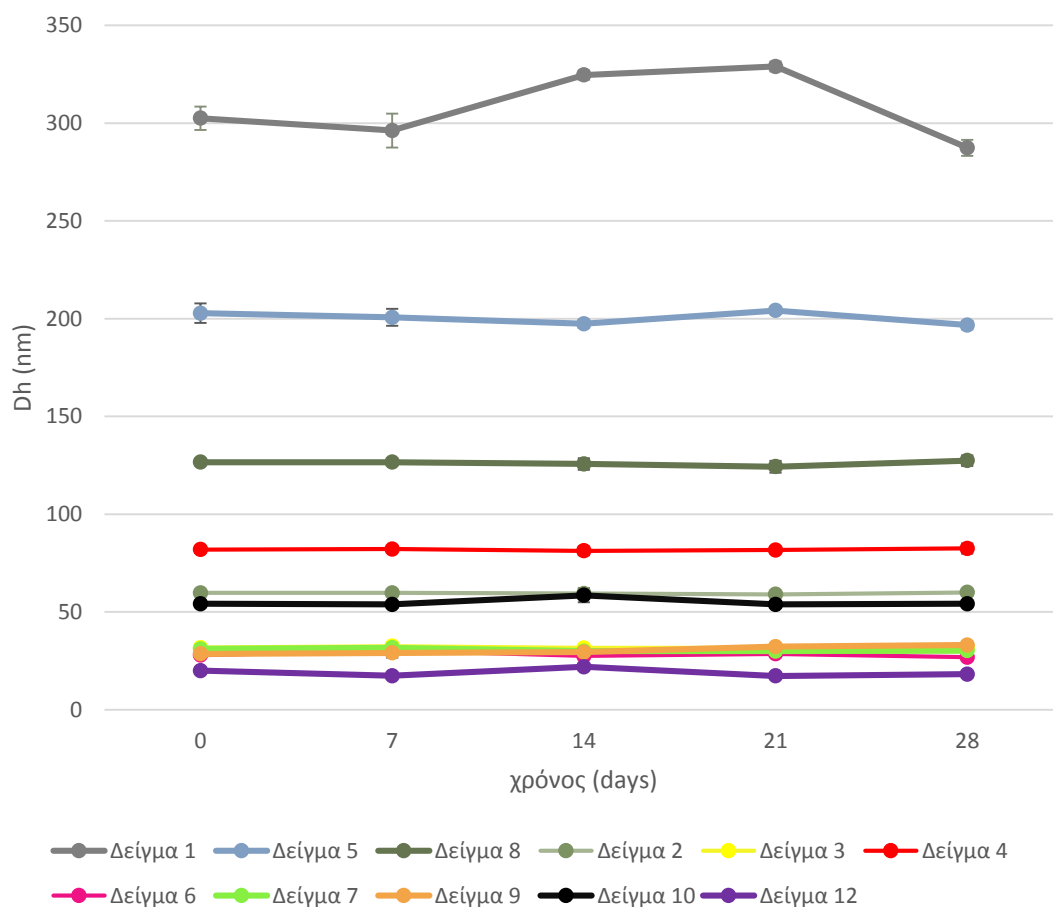
6.1. Μακροσκοπική

Τα δείγματα παρακολουθήθηκαν για τη σταθερότητα του για διάστημα 3 μηνών σε συνθήκες δωματίου. Τα αποτελέσματα της παρακολούθησης αυτής συνοψίζονται στα παρακάτω

- i. Η συνταγή 11 που περιείχε τη μέγιστη ποσότητα μίγματος ελαίων (5%) και την ελάχιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού (2%) παρουσίασε αστάθεια και 5 ημέρες μετά την παραγωγή του το γαλάκτωμα διαχωρίστηκε.
- ii. Οι υπόλοιπες 11 συνταγές ήταν σταθερές για όλο το χρονικό διάστημα στο οποίο διατηρήθηκαν.

6.2. Μέτρηση Κατανομής Μεγέθους Σταγονιδίων Εσωτερικής Φάσης

Στο γράφημα που ακολουθεί παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων του μεγέθους σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης καθώς και ο δείκτης πολυδιασποράς τους για τις χρονικές στιγμές 0 days, 7 days, 14 days, 21 days και 28 days. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στο Παράρτημα Β.



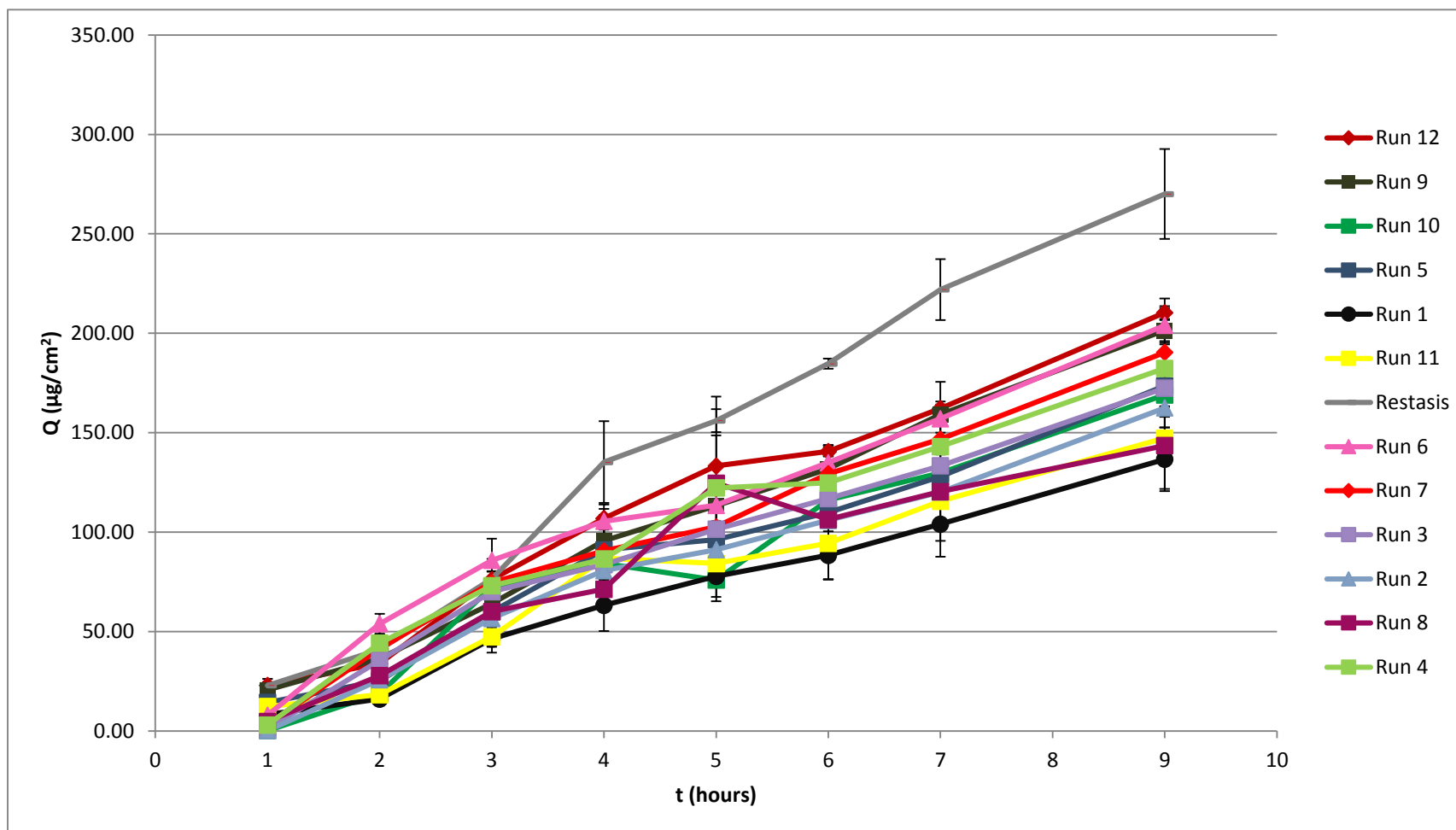
Γράφημα 5: Μελέτη σταθερότητας για την απόκριση Dh

Όπως φαίνεται και από το γράφημα, όλες οι συνταγές με εξαίρεση το δείγμα 2 είχαν εξαιρετικά καλή σταθερότητα σε βάθος χρόνου. Τόσο το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης όσο και ο δείκτης πολυδιασποράς τους παρέμειναν σταθερά για το διάστημα του ενός μήνα στο οποίο μελετήθηκαν.

7. In vitro Πειράματα Διάχυσης

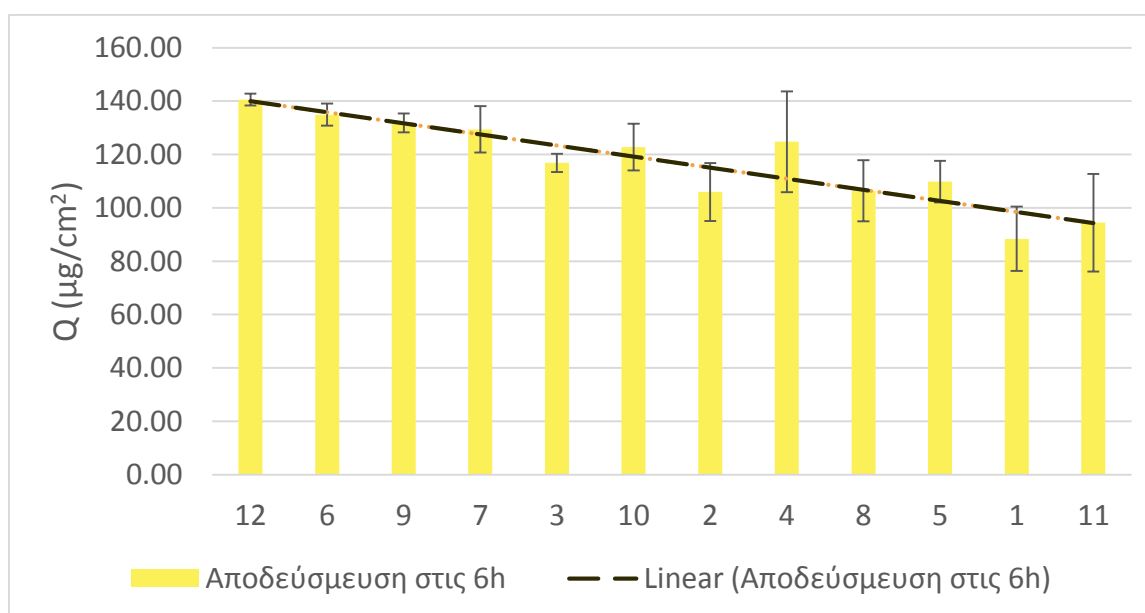
Για την in vitro αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης πραγματοποιήθηκε πείραμα διάχυσης η διάταξη του οποίου περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.10. Αρχικά σαν διάλυμα υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός (δ/μα 0.9% NaCl) ώστε να προσομοιάζει όσο το δυνατόν το δακρυϊκό υγρό. Οι συνθήκες του πειράματος με το συγκεκριμένο διάλυμα υποδοχέα έχουν περιγραφεί βιβλιογραφικά [82] [83] και ακολουθήθηκαν με μικρές τροποποιήσεις. Ωστόσο σε αυτό το διάλυμα υποδοχέα η ποσότητα της κυκλοσπορίνης ήταν μη ανιχνεύσιμη μέχρι και 24 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Για την βελτίωση των συνθηκών δεξαμενής χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σαν διάλυμα υποδοχέα 0.5 % Sodium Dodecyl Sulfate [79], όμως και πάλι η ανίχνευση της κυκλοσπορίνης ήταν αδύνατη. Εν τέλει κρίθηκε αναγκαία η χρήση ενός μη φυσιολογικού διαλύτη ως διάλυμα υποδοχέα στον οποίο η κυκλοσπορίνη να έχει ικανοποιητική διαλυτότητα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε απόλυτη αιθανόλη (Absolute EtOH) HPLC καθαρότητας.

Στο *Γράφημα 6* απεικονίζεται η αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης στον διάλυμα υποδοχέα Absolute EtOH ανά μονάδα επιφάνειας όλων των δειγμάτων για το χρονικό διάστημα των 9 ωρών.



Γράφημα 6: Ποσότητα της κυκλοσπορίνης ανά μονάδα επιφανείας (Q) για το χρονικό διάστημα των 9 ωρών

Το *Γράφημα 7* αποτελεί την απεικόνιση την ποσότητα της κυκλοσπορίνης που αποδεσμεύεται στις 6 ώρες ανά μονάδα επιφάνειας για κάθε μία από τις 12 συνταγές που παρασκευάστηκαν. Οι συνταγές έχουν τοποθετηθεί στο γράφημα με αύξουσα σειρά μεγέθους σταγονιδίων εσωτερικής φάσης. Από το γράφημα είναι φανερό ότι υπάρχει μία πτωτική τάση της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης όσο το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης αυξάνεται. Η τάση αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η συνολική επιφάνεια των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης μειώνεται όσο το μέγεθος τους αυξάνεται επομένως μειώνεται και αποδέσμευση από την επιφάνεια αυτή.



Γράφημα 7: Ποσότητα της κυκλοσπορίνης ανά μονάδα επιφανείας (Q) για τη χρονική στιγμή t=6h

8. Πειραματικός Σχεδιασμός

Οι τεχνικές του πειραματικού σχεδιασμού χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για να μελετηθεί η επίδραση των συστατικών του μίγματος στο μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος και στην αποδέσμευση του δραστικού συστατικού. Οι αποκρίσεις που επιλέχθηκαν για την μελέτη των παραπάνω ήταν η μέση υδροδυναμική διάμετρος (Dh) των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος καθώς και η ποσότητα της κυκλοσπορίνης που αποδεσμεύεται στις 6 ώρες ανά μονάδα επιφάνειας (Q).

Οι αποκρίσεις αυτές εισήχθησαν στο λογισμικό Design-Expert 8.0.0 και μετά την επιλογή του κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου έγινε έλεγχος καταλληλότητας του με στατιστικούς δείκτες. Ακολούθησε ανάλυση διασποράς (ANOVA) για το συγκεκριμένο μοντέλο. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς δείχνουν την επίδραση που έχει ο κάθε παράγοντας του σχεδιασμού (Πίνακας 8) στις αποκρίσεις που επιλέχθηκαν.

Τα μαθηματικά μοντέλα που επιλέχθηκαν, έτσι ώστε να αποδίδεται επαρκώς η σχέση της απόκρισης και των παραγόντων που εισήχθησαν στον πειραματικό σχεδιασμό καθώς και οι στατιστικοί δείκτες που προέκυψαν από την ανάλυση διασποράς του μοντέλου (ANOVA) δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

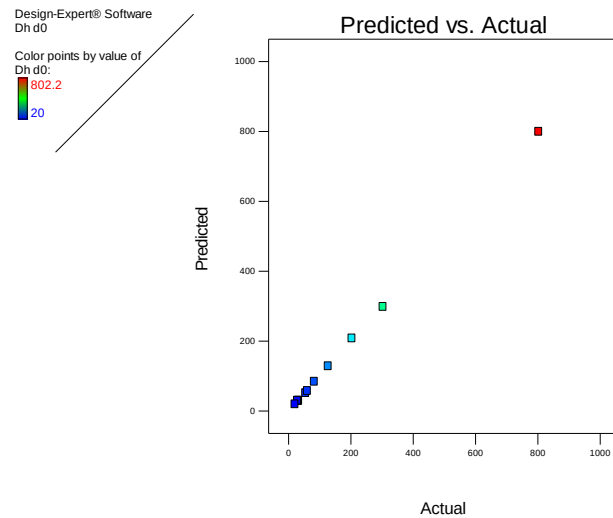
Πίνακας 13: Επιλογή κατάλληλου μοντέλου και ανάλυση διασποράς (ANOVA) για τις δύο αποκρίσεις

Απόκριση	Μοντέλο	R-squared	Adj. R-squared	Pred. R-squared	Adeq. Precision
Droplet Size (Dh)	Special Cubic	0.9996	0.9991	0.9945	148.662
Cumulative Release 6h (Q)	Linear Mixture	0.8136	0.7722	0.7227	13.065

Η τιμή της πιθανότητας p ορίστηκε στο επίπεδο 0,0005 (σε διάστημα εμπιστοσύνης 99,95%).

Ο συντελεστής προσδιορισμού R , χρησιμοποιείται στην τετραγωνική του μορφή (R^2) και εκφράζει το ποσοστό της μεταβλητότητας που εξηγείται από το μοντέλο. Οι τιμές του κυμαίνονται από 0 έως 1 και το μοντέλο έχει καλή προσαρμογή στα δεδομένα όταν ο δείκτης πλησιάζει τη μονάδα. Ένας καταλληλότερος δείκτης που χρησιμοποιείται είναι ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού R^2_{adj} (adjusted R^2), ο οποίος λαμβάνει υπόψιν του και τους βαθμούς ελευθερίας που συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων των μοντέλων. Επίσης, το μέγεθος R^2_{pred} (predicted R^2), εκτιμά το μέγεθος της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγήσει το μοντέλο και σχετίζεται με τη δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Οι δείκτες predicted R-squared και adjusted R-squared πρέπει να έχουν διαφορά το πολύ 0,20. Σε αντίθετη περίπτωση υποδηλώνεται πρόβλημα είτε με τα δεδομένα είτε με το μοντέλο οπότε και απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων και εξέταση περίπτωσης εκτέλεσης κάποιου μετασχηματισμού της απόκρισης ή ανάγκης χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Επίσης, υπολογίστηκε η τιμή του Adeq. Precision, στατιστικό μέγεθος το οποίο συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης και αντιπροσωπεύει το μέτρο της επάρκειας της ακρίβειας του μαθηματικού μοντέλου. Τιμές μεγαλύτερες του 4 υποδεικνύουν πως η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής.

Το *Γράφημα 8* αναπαριστά την συσχέτιση των προβλεπόμενων τιμών με τις πραγματικές για την απόκριση Dh. Από το γεγονός ότι όλες οι συνταγές αποτελούν σημεία της ευθείας συμπεραίνουμε ότι το μοντέλο έχει πολύ καλή συσχέτιση.



Γράφημα 8: Συσχέτιση προβλεπόμενων τιμών με πραγματικές για την απόκριση Dh

8.1. Απόκριση Dh

Στον Πίνακα 14 παρατίθεται η ανάλυση διασποράς (ANOVA) για το γραμμικό μοντέλο της απόκρισης Dh.

Πίνακας 14: Ανάλυση διασποράς (ANOVA) για το γραμμικό μοντέλο της απόκρισης Dh

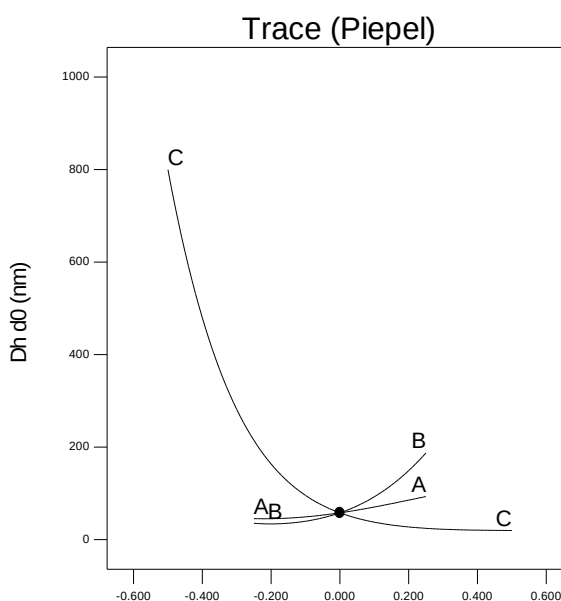
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	535.5259	6	89.25432	2025.256	<0,0001	σημαντικό
Linear						
Mixture	428.0206	2	214.0103	4856.076	<0,0001	σημαντικό
AB	1.780401	1	1.780401	40.39881	0.0014	σημαντικό
AC	0.001976	1	0.001976	0.044827	0.8407	
BC	5.87907	1	5.87907	133.4011	<0,0001	σημαντικό
ABC	6.444294	1	6.444294	146.2265	<0,0001	σημαντικό
Residual	0.220353	5	0.044071			
Lack of Fit	0.194169	4	0.048542	1.85389	0.4966	Μη σημαντικό
Cor Total	535.7463	11				

Η τιμή $p\text{-value} < 0,0001$ υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό. Υπάρχει μόνο 0,01% πιθανότητα το μέγεθος αυτό να οφείλεται στο «θόρυβο». Οι όροι του μοντέλου που είναι στατιστικά σημαντικοί είναι εκείνοι με $p\text{-value} < 0,05$. Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι όροι A (MCT), B (Castor Oil), C (Kolliphor HS 15) και οι αλληλεπιδράσεις των όρων, AB, BC, και ABC. Η τιμή του “Lack of Fit” στο 1,85 περίπου σημαίνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το καθαρό σφάλμα κάτι που είναι επιθυμητό.

Στο *Γράφημα 9* παρατηρείται η εμφανώς ότι τη σημαντικότερη επίδραση στη μείωση της D_h την έχει η αύξηση του επιφανειοδραστικού Kolliphor με την ταυτόχρονη μείωση των δύο ελαίων. Η αύξηση των παραγόντων A και B, δηλαδή τα δύο έλαια, με την ταυτόχρονη μείωση του επιφανειοδραστικού δεν επηρεάζουν σημαντικά την απόκριση της υδροδυναμικής διαμέτρου.

Design-Expert® Software
Component Coding: Actual
Original Scale
Dh d0 (nm)

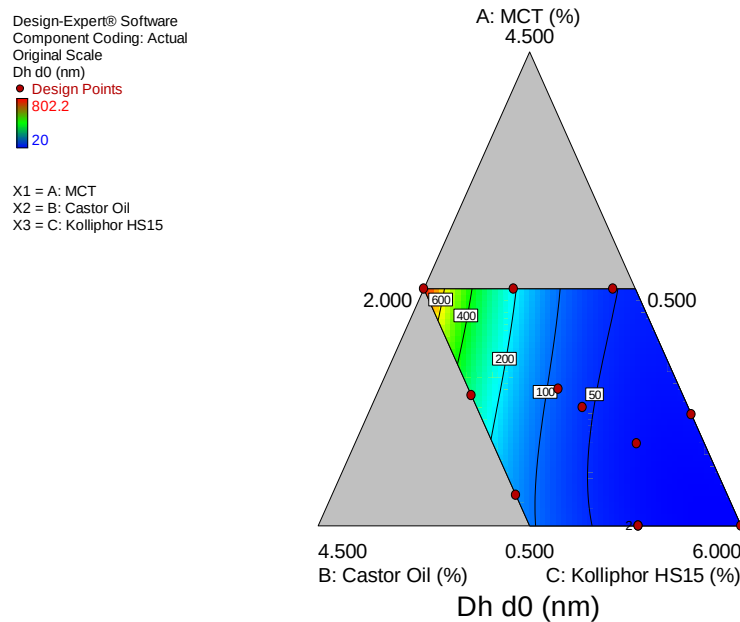
Actual Components
A: MCT = 1.500
B: Castor Oil = 1.500
C: Kolliphor HS15 = 4.000



Γράφημα 9: Επίδραση των συστατικών του μίγματος στην απόκριση D_h

Η μείωση της D_h λόγω της αύξησης του επιφανειοδραστικού είναι εμφανής και στο *Γράφημα 10*. Η περιοχή στην οποία η D_h είναι ελάχιστη απεικονίζεται με μπλε χρώμα και

είναι αυτές με υψηλά ποσοστά επιφανειοδραστικού ενώ στις κόκκινες περιοχές έχουμε τις μέγιστες τιμές των ελαίων και κατά συνέπεια της Dh.



Γράφημα 10: Απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Dh

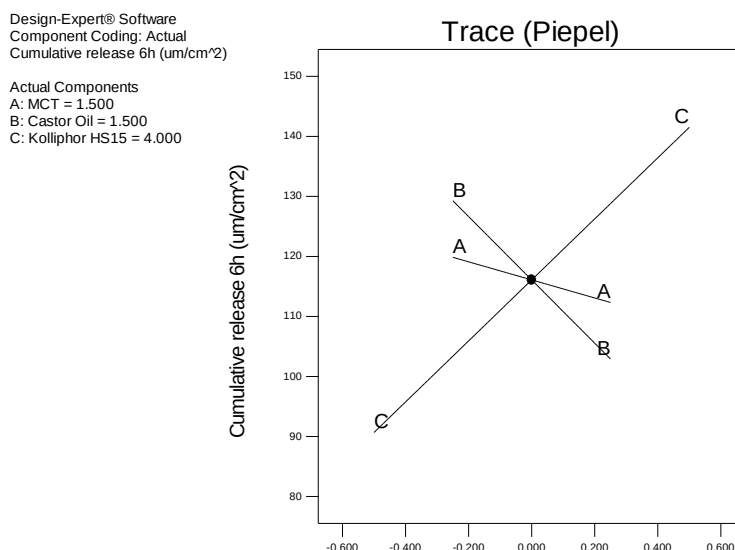
8.2. Απόκριση Q

Στον παρατίθεται η ανάλυση διασποράς (ANOVA) για το γραμμικό μοντέλο της απόκρισης Q.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2379.2	2	1189.6	19.64	0.0005	σημαντικό
Linear Mixture	2379.2	2	1189.6	19.64	0.0005	
Residual	545.01	9	60.56			
Lack of Fit	542.08	8	67.76	23.14	0.1595	Μη σημαντικό
Pure Error	2.93	1	2.93			
Cor Total	2924.21	11				

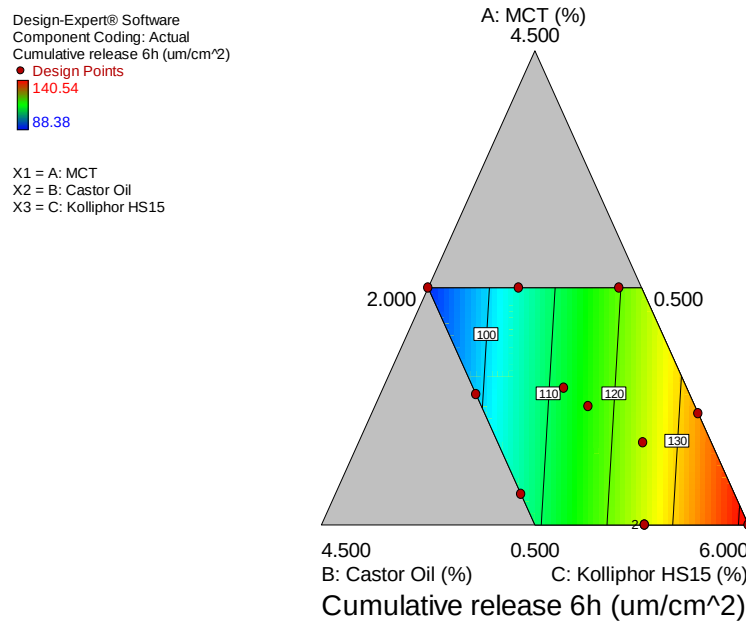
Η τιμή p-value στο 0,0005 υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό σε διάστημα εμπιστοσύνης 99,95%. Υπάρχει μόνο 0,05% πιθανότητα το μέγεθος αυτό να οφείλεται στο «θόρυβο». Οι όροι του μοντέλου που είναι στατιστικά σημαντικοί είναι εκείνοι με $p\text{-value} < 0,05$. Στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι και οι τρεις όροι A (MCT), B (Castor Oil) και C (Kolliphor HS 15). Η τιμή του "Lack of Fit" στο 23,14 περίπου σημαίνει ότι δεν είναι σημαντικό σε σχέση με το καθαρό σφάλμα κάτι που είναι επιθυμητό. Υπάρχει 15.95% πιθανότητα η τόσο μεγάλη τιμή "Lack of Fit" να οφείλεται στον «θόρυβο».

Από τις κλίσεις των ευθειών των παραγόντων C (Kolliphor HS 15) και B (Castor Oil) συμπεραίνουμε ότι οι δύο αυτοί παράγοντες έχουν εξίσου σημαντική επίδραση στην αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης. Με την αύξηση του επιφανειοδραστικού η απόκριση Q αυξάνεται ενώ με την αύξηση του Castor Oil η απόκριση Q μειώνεται. Ο παράγοντας MCT (A) δεν έχει τόσο σημαντική επίδραση στην αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης.



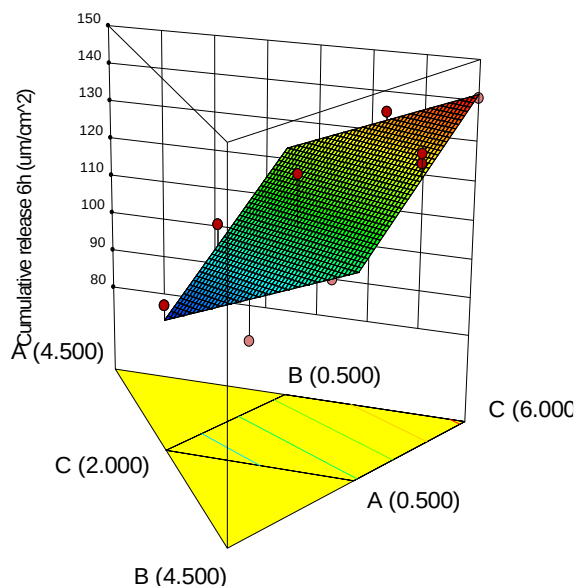
Γράφημα 11 Επίδραση των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα επιφάνειας για την απόκριση Q σε δυσδιάστατη (Γράφημα 12) και σε τρισδιάστατη (Γράφημα 13) απεικόνιση. Οι γραμμές που χαράσσονται στην έγχρωμη περιοχή αντιπροσωπεύουν όλες τις διαφορετικές αναλογίες των παραγόντων του μίγματος που έχουν σαν απόκριση την τιμή που αναγράφεται πάνω στην ευθεία.



Γράφημα 12: Απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q

Design-Expert® Software
 Component Coding: Actual
 Cumulative release 6h (um/cm²)
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 140.54
 88.38
 X1 = A: MCT
 X2 = B: Castor Oil
 X3 = C: Kolliphor HS15



Γράφημα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q

8.3. Βελτιστοποίηση Μοντέλου

Η βελτιστοποίηση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με την ελαχιστοποίηση της απόκρισης Dh και τη μεγιστοποίηση της απόκρισης Q. Τις προϋποθέσεις αυτές τις ικανοποιεί μία και μόνο συνταγή: το δείγμα 12, το οποίο έχει τη μέγιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού και την ελάχιστη ποσότητα ελαίων. Επιπλέον παρατηρούμε ότι οι προβλεπόμενες τιμές για τις δύο αποκρίσεις είναι πολύ κοντά στις πραγματικές τιμές που μετρήσαμε, συνεπώς το μοντέλο έχει καλή συσχέτιση. Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Βελτιστοποίηση μοντέλου

Constraints

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:MCT	is in range	0.5	2.5	1	1	3
B:Castor Oil	is in range	0.5	2.5	1	1	3
C:Kolliphor	is in range	2	6	1	1	3
Dh	minimize	20	802.2	1	1	3
Q	maximize	88.38	140.54	1	1	3

Solution

Δείγμα 12	MCT	Castor Oil	Kolliphor	Dh	Q	Desirability
Προβλεπόμενες Τιμές	0.50	0.50	6.00	19.79	141.51	1.000
Πραγματικές Τιμές	0.50	0.50	6.00	20.0	140.54	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα μελέτη μπορούν να συνοψισθούν στα παρακάτω:

Είναι εφικτή η παρασκευή γαλακτωμάτων με ασφαλή και εγκεκριμένα έκδοχα κατάλληλα για οφθαλμική χρήση, τα οποία περιέχουν θεραπευτική δόση κυκλοσπορίνης διαλυμένη στην εσωτερική τους φάση. Η διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης ήταν ικανοποιητική για τα έλαια Castor Oil, Corn Oil και MCT ενώ στο έλαιο Paraffin Oil η κυκλοσπορίνη ήταν δυσδιάλυτη. Επιπλέον τα γαλακτώματα αυτά είναι δυνατό να έχουν μέγεθος σταγονιδίων εσωτερικής φάσης μικρότερο από 100nm γεγονός που τα καθιστά ημιδιάφανα ή διάφανα, χαρακτηριστικό επιθυμητό για τα οφθαλμικά σκευάσματα.

Από τις 12 συνταγές που παρασκευάστηκαν μόνο η μία ήταν ασταθής ενώ οι υπόλοιπες 11 ήταν σταθερές μακροσκοπικά για 3 μήνες από την παρασκευή τους και η ποσότητα της κυκλοσπορίνης παρέμεινε εντός των ορίων που ορίζει η Φαρμακοποιία για το διάστημα αυτό. Επιπλέον η υδροδυναμική διάμετρος καθώς και ο δείκτης πολυδιασποράς είχαν εξαιρετικά σταθερές τιμές καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων τους (28 ημέρες).

Από τα αποτελέσματα του Πειραματικού Σχεδιασμού για τις δύο αποκρίσεις μπορούμε να εξάγουμε τα παρακάτω συμπεράσματα:

Για την απόκριση της υδροδυναμικής διαμέτρου των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης:

- Από τους παράγοντες που μελετήθηκαν για την μεταβολή υδροδυναμικής διαμέτρου την μεγαλύτερη επίδραση είχε ο παράγοντας C, δηλαδή το επιφανειοδραστικό Kolliphor HS 15. Είναι φανερό ότι με την αύξηση της ποσότητας του επιφανειοδραστικού το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται.

- Αν και τα έλαια είχαν πολύ μικρότερη επίδραση στην απόκριση αυτή, μπορεί να σημειωθεί ότι μεταξύ των δύο αυτή του Castor Oil ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη. Πιο συγκεκριμένα, με την αύξηση του Castor Oil η υδροδυναμική διάμετρος αυξάνεται.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι για την ελαχιστοποίηση της απόκρισης αυτής απαιτείται μέγιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού έναντι των ελαίων και από τα δύο έλαια προτιμάται αυτό που έχει την ελάχιστη επίδραση, δηλαδή το MCT.

Για την απόκριση της ποσότητας της κυκλοσπορίνης που αποδεσμεύεται ανά μονάδα επιφάνειας στον διάστημα των 6 ωρών:

- Οι παράγοντες Castor Oil και το επιφανειοδραστικό Kolliphor, έχουν εξίσου σημαντική επίδραση. Με την αύξηση του επιφανειοδραστικού αυξάνεται και ποσότητα της κυκλοσπορίνης που αποδεσμεύεται ενώ με την αύξηση του Castor Oil συμβαίνει το αντίθετο, η ποσότητα της κυκλοσπορίνης μειώνεται.

Συνεπώς για την μεγιστοποίηση της αποδεσμευόμενης κυκλοσπορίνης είναι απαραίτητη η μέγιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού ενώ από τα δύο έλαια θα επιλέγαμε και πάλι το MCT, το οποίο έχει μικρότερη αρνητική επίδραση σε σχέση με το Castor Oil.

Παρατηρείται λοιπόν μία τάση αύξησης της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης με την μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι όσο μειώνεται το μέγεθος των σταγονιδίων τόσο αυξάνεται η εξωτερική τους επιφάνεια, δηλαδή η ελεύθερη επιφάνεια αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ιδανική συνταγή είναι αυτή του γαλακτώματος 12, το οποίο έχει τη μέγιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού και την ελάχιστη ποσότητα ελαίων. Στον παρατίθεται η σύγκριση του εν λόγω γαλακτώματος με το πρότυπο γαλάκτωμα.

Γαλάκτωμα	D_h (nm)	PD.I.	Z-pot (mV)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Συνταγή12	20.0 ± 0.4	0.294 ± 0.056	-3.4 ± 2.5	140.54 ± 2.23
Πρότυπο	965.8 ± 109.3	0.822 ± 0.246	-11.4 ± 1.8	184.69 ± 2.54

Σαν επόμενο βήμα προτείνεται η μελέτη της ωσμωτικότητας του σκευάσματος αυτού καθώς και της πιθανής τοξικότητας του, όπως απαιτείται για όλες τις νέες φαρμακοτεχνικές μορφές. Επίσης θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν σε βάθος οι συνθήκες παρασκευής του γαλακτώματος (θερμοκρασία, στάδιο ρύθμισης pH, μέθοδος γαλακτωματοποίησης) και οι επιδράσεις που μπορεί να έχουν αυτές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αλλά και στο μικροβιακό του φορτίο. Τέλος ένα επόμενο βήμα για την αξιολόγηση του σκευάσματος θα ήταν η *in vitro* εκτίμηση με τη χρήση κερατοειδούς από πειραματόζωα.

Βιβλιογραφία

- [1] «PubChem,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cyclosporin_A#section=Chemical-and-Physical-Properties. [Πρόσβαση 10 2 2016].
- [2] E. Tayar, A. Mark, P. Vallat και R. Brunne, «Solvent-dependent conformation and hydrogen-bonding capacity of cyclosporin A: evidence from partition coefficients and molecular dynamics simulations,» *Journal of Medicinal Chemistry*, τόμ. 36, αρ. 24, pp. 3757 - 3764, 1993.
- [3] F. Lallemand, O. Felt-Baeyens, K. Besseghirb, F. Behar-Cohenc και R. Gurny, «Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, τόμ. 56, pp. 307 - 318, 2003.
- [4] The Merck Index, 12 επιμ., New York: CRC Press, 1996.
- [5] S. D. Mithani, V. Bakatselou, C. N. TenHoor και J. B. Dressman, «Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration,» *Pharmaceutical Research*, τόμ. 13, αρ. 1, pp. 163 - 167, 1996.
- [6] W. P. Cheng, A. I. Grey, L. Tetley, T. L. B. Hang, A. G. Schätzlein και I. F. Uchegbu, «Polyelectrolyte Nanoparticles with High Drug Loading Enhance the Oral Uptake of Hydrophobic Compounds,» *Biomacromolecules*, τόμ. 7, αρ. 5, pp. 1509 - 1520, 2006.
- [7] V. Gupta και P. Sahu, «Topical cyclosporin A in the management of vernal keratoconjunctivitis.,» *Eye*, τόμ. 15, pp. 39-41., 2001.

- [8] K. S. Kunert, A. S. Tisdale και I. K. Gipson, «Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine.,» *Archives of Ophthalmology*, τόμ. 1220, αρ. 3, pp. 330-337., 2002.
- [9] H. Perry, S. Doshi , E. Donnenfeld και G. Bai, «Topical cyclosporin A in the management of therapeutic keratoplasty for mycotic keratitis.,» *Cornea*, τόμ. 21, αρ. 2, pp. 161-163., 2002.
- [10] A. Drossos, F. Skopouli, J. Costopoulos, C. Papadimitriou και H. Moutsopoulos, «Cyclosporin A (CyA) in primary Sjögren's syndrome: a double blind study.,» *Annals of the Rheumatic Diseases*, τόμ. 45, αρ. 9, pp. 732-735., 1986.
- [11] «Report of the Dry Eye WorkShop,» *The Ocular Surface*, τόμ. 5, αρ. 2, 2007.
- [12] P. D. O'Brien και L. . M. T. Collum, «Dry eye: diagnosis and current treatment strategies,» *Current Allergy and Asthma Reports*, τόμ. 4, αρ. 4, pp. 314 - 319, 2004.
- [13] S. C. Pflugfelder, «Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease,» *American Journal of Managed Care*, τόμ. 14, αρ. 3, pp. 102 - 106, 2008.
- [14] «EyeDayClinic,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.eyeclinic.com.gr/el/suxnes-erwtiseis/item/10-ksirofthalmia.html>. [Πρόσβαση 8 February 2016].
- [15] S. C. Pflugfelder, «Antiinflammatory Therapy for Dry Eye,» *American Journal of Ophthalmology*, τόμ. 137, αρ. 2, pp. 337 - 342, 2004.

- [16] C. Schultz, «Safety and Efficacy of Cyclosporine in the Treatment of Chronic Dry Eye,» *Ophthalmology and Eye Diseases*, τόμ. 6, pp. 37 - 42, 2014.
- [17] P. Mertzanis, L. Abetz, K. Rajagopalan και et al., «The Relative Burden of Dry Eye in Patients' Lives: Comparisons to a U.S. Normative Sample,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, τόμ. 46, αρ. 1, pp. 46 - 50, 2005.
- [18] S. Matsuda και S. Koyasu, «Mechanisms of action of cyclosporine,» *Immunopharmacology*, τόμ. 47, αρ. 2-3, pp. 119-125, 2000.
- [19] S. Noble και A. Markham, «A Review of the Pharmacokinetic Properties, Clinical Efficacy and Tolerability of a Microemulsion-Based Formulation (Neoral®),» *Drugs*, τόμ. 50, αρ. 5, pp. 924-941, 1995.
- [20] K. Sall, O. D. Stevenson, T. K. Mundorf και B. L. Reis, «Two Multicenter, Randomized Studies of the Efficacy and Safety of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion in Moderate to Severe Dry Eye Disease,» *Ophthalmology*, τόμ. 107, αρ. 4, pp. 631 - 639, 2000.
- [21] R. Kaswan, «Method of increasing tear production by topical administration of cyclosporin». United States of America, Georgia Ευρεσιτεχνία US4839342A, 13 June 1989.
- [22] S. Ding, W. L. Tien και O. Olejnik, «Non-irritating emulsions for sensitive tissue». Ευρεσιτεχνία US5474979, 12 December 1995.

- [23] A. Acheampong, D. D. Tang-Liu, J. N. Chang και D. F. Power, «Methods of providing therapeutic effects using cyclosporin components». USA Ευρεσιτεχνία US8642556 B2, 14 February 2014.
- [24] B. Philips, S. Bague, L. Rabinovich-Guilatt και G. Lambert, «Ophthalmic emulsion containing an immunosuppressive agent». Ευρεσιτεχνία US 8298569 B2, 30 October 2012.
- [25] D. BenEzra, G. Maftzir, C. de Courten και P. Timonen, «Ocular penetration of cyclosporin A. III: The human eye,» *British Journal of Ophthalmology*, τόμ. 74, pp. 350 - 352, 1990.
- [26] L. Cheeks, . R. Kaswan και K. Green, «Influence of vehicle and anterior chamber protein concentration on cyclosporine penetration through the isolated rabbit cornea.,» *Current Eye Researc*, τόμ. 11, pp. 641 - 649, 1992.
- [27] P. Furrer, J. Mayer, B. Plazonnet και . R. Gurny, «Ocular tolerance of preservatives on the murine cornea,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, τόμ. 47, pp. 105 - 112, 1999.
- [28] D. D. Tang-Liu, B. J. Richman, J. R. Weinkam και H. Takruri, «Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro.,» *Journal of Pharmaceutical Sciences*, τόμ. 83, αρ. 1, pp. 85 - 90, 1994.
- [29] M. Kuwano, H. Ibuki, N. Morikawa, A. Ota και Y. Kawashima, «Cyclosporine A formulation affects its ocular distribution in rabbits,» *Pharmaceutical Research*, τόμ. 19, αρ. 1, pp. 108 - 111, 2002.

- [30] P. Aksungur, M. Demirbilek, E. Denkbaş, J. Vandervoort, A. Ludwig και N. Unlü, «Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies,» *Journal of Controlled Release*, τόμ. 151, pp. 286 - 294, 2011.
- [31] A. Zimmer, J. Kreuter και J. R. Robinson, «Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues,» *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*, τόμ. 8, αρ. 4, pp. 497 - 504, 1991.
- [32] A. M. De Campos, A. Sa´nchez και M. J. Alonso, «Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A,» *International Journal of Pharmaceutics*, τόμ. 224, p. 159–168, 2001.
- [33] J. Milani, U. Pleyer, A. Dukes, H. Chou, S. Lutz, D. Rückert , K. Schmidt και B. Mondino, «Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporine in the rat eye.,» *Ophthalmology*, τόμ. 100, αρ. 6, pp. 890-896, 1993.
- [34] J. Shen, Y. Deng, X. Jin, Q. Ping, Z. Su και L. Li, «Thiolated Thiolated nanostructured lipid carriers as a potential ocular drug delivery system for cyclosporine A: Improving in vivo ocular distribution.,» *International Journal of Pharmaceutics*, τόμ. 402, pp. 248 - 253, 2010.
- [35] «Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.sefh.es/fichadjuntos/COLIRIOCICLOSPORINA0.5_.doc. [Πρόσβαση 3 15 2016].
- [36] «Nationwide Children's,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ua>

ct=8&ved=0ahUKEwiL_KSr-
ZjMAhXMIJoKHcajAtwQFggaMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.nationwidechildr
ens.org%2FDocument%2FGet%2F78774&usg=AFQjCNGvKhfqAQXTgym55qWYs
SQT90ry0g&sig2=rcL0a9LLaV3oy4dp3. [Πρόσβαση 15 3 2016].

- [37] T. Vandamme, «Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges,» *Progress in Retinal and Eye Research*, τόμ. 21, pp. 15 - 34, 2002.
- [38] T. Tadrosa, P. Izquierdob, J. Esquenab και C. Solans, «Formation and stability of nano-emulsions,» *Advances in Colloid and Interface Science*, Τόμ. %1 από %2108-109, pp. 303 - 318, 2004.
- [39] J. D. McClements και J. Rao, «Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity.,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, τόμ. 51, αρ. 4, pp. 285 - 330, 2011.
- [40] K. P. Velikov και E. Pelan, «Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals,» *Soft Matter*, τόμ. 4, αρ. 10, pp. 1964 - 1980, 2008.
- [41] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang και S. M. Graves, «Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties,» *Journal Of Physics: Condensed Matter*, τόμ. 18, pp. 635 - 666, 2006.
- [42] P. Santos, A. C. Watkinson, J. Hadgraft και M. E. Lane, «Application of Microemulsions in Dermal and Transdermal Drug Delivery,» *Skin Pharmacology Physiology*, τόμ. 21, p. 246 – 259, 2008.

- [43] H. Chen, C. Khemton, X. Yang, X. Chang και J. Gao, «Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs,» *Drug Discovery Today*, τόμ. 16, αρ. 7-8, pp. 354 - 360, 2011.
- [44] E. Acosta, «Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery,» *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, τόμ. 14, αρ. 1, pp. 3 - 15, 2009.
- [45] I. Danielsson και B. Lindman, «The definition of microemulsion,» *Colloids and Surfaces*, τόμ. 3, αρ. 4, pp. 391 - 392, 1981.
- [46] T. P. Hoar και J. H. Schulman, «Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle,» *Nature*, τόμ. 152, pp. 102 - 103, 1943.
- [47] J. H. Schulman, W. Stoeckenius και L. M. Prince, «Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy,» *The Journal of Physical Chemistry*, τόμ. 63, αρ. 10, pp. 1677 - 1680, 1959.
- [48] A. W. Adamson, «A model for micellar emulsions,» *Journal of Colloid and Interface Science*, τόμ. 29, αρ. 2, pp. 261 - 267, 1969.
- [49] D. Langevin, J. Meunier και A. M. Cazabat, «Les microemulsions.,» *La recherche*, τόμ. 167, αρ. 16, p. 720 – 728, 1985.
- [50] D. J. McClements, «Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities,» *Soft Matter*, τόμ. 8, p. 1719 – 1729, 2012.

- [51] J. M. Lawrence και G. D. Rees, «Microemulsion-based media as novel drug delivery systems,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, τόμ. 45, p. 89 – 121, 2000.
- [52] B. Jonsson, B. Lindman, K. Holmberg και B. Kronberg, *Surfactants & Polymers in Aqueous Solutions*, Chichester, U.K.: John Wiley & Sons, 1998.
- [53] P. A. Winsor, «Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes,» *Transactions of the Faraday Society*, τόμ. 44, pp. 376 - 398, 1948.
- [54] S. P. Moulik και A. K. Rakshit, «Physicochemistry and Applications of Microemulsions,» *Journal of Surface Science and Technology*, τόμ. 22, αρ. 3-4, pp. 159-186, 2006.
- [55] A. M. Bellocq, J. Biais, P. Bothorel, B. Clin, G. Fourche, P. Lalanne, B. Lemaire, B. Lemanceau και D. Roux, «Microemulsions,» *Advances in Colloid and Interface Science*, τόμ. 20, αρ. 3-4, pp. 167 - 272, 1984.
- [56] D. J. Eastoe, «3. Microemulsions,» σε *Surfactant Chemistry*, Bristol UK, 12 May 2003, pp. 59 - 95.
- [57] J. N. Israelachvili, J. D. Mitchell και B. W. Ninham , «Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers,» *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, τόμ. 72, pp. 1525 - 1568, 1976.
- [58] M. Salim, H. Minamikawa, A. Sugimura και R. Hashim, «Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics,» *Journal of Medicinal Chemical Communications*, τόμ. 5, αρ. 11, pp. 1602-1618, 2014.

- [59] W. C. Griffin, «Classification Of Surface-Active Agents by "HLB",» *Journal of Cosmetic Science*, τόμ. 1, αρ. 5, pp. 311-326, 1949.
- [60] W. C. Griffin, «Calculation Of HLB Values of non-ionic Surfactants,» *Journal of Cosmetic Science*, τόμ. 5, αρ. 4, pp. 249-256, 1954.
- [61] J. Israelachvili, «The science and applications of emulsions - an overview,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, τόμ. 91, pp. 1-8, 1994.
- [62] D. Attwood, *Surfactant Systems: Their chemistry, pharmacy and biology*, London: Chapman & Hall, 1983.
- [63] S. Tamilvanan και S. Benita, «The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, τόμ. 58, p. 357 – 368 , 2004.
- [64] S. Benita και S. Muchtar, «Ophthalmic compositions». Ευρεσιτεχνία EP0521799 A1, 1992.
- [65] G. Lewis, D. Mathieu και R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, N. Y., ΗΠΑ: Marcel Dekker, 1999.
- [66] R. H. Shobha και K. Vanaja, «Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design.,» *Clinical Research and Regulatory Affairs*, τόμ. 24, αρ. 1, pp. 1 - 23, 2007.

- [67] «NIST Glossary-National Institute of Standards and Technology,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/glossary.htm>.
- [68] T. Pyzdek, *The Six Sigma Handbook*, N.Y, ΗΠΑ: McGraw Hill, 2003.
- [69] D. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 4th επιμ., N.Y., Η.Π.Α.: John Wiley&Sons, Inc.,, 1997.
- [70] M. D.C., «Experimental design for product and process design and development,» *The Statistician*, τόμ. 48, αρ. Part 2, pp. 159 - 177, 1999.
- [71] C. V., «One-Factor-at-a-Time versus Designed Experiments,» *The American Statistician*, τόμ. 53, αρ. 2, 1999.
- [72] Δ. Γεωργακή, Κ. Κουρούπη, Σ. Πολίτης και Δ. Ρέκκας, *Διαχείριση ολικής ποιότητας*, Αθήνα: Εκδόσεις Σιδέρη, 2010.
- [73] D. M. E. James, *Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Applications*, τόμ. 11, Chapman & Hall, 1999.
- [74] N. A. Armstrong, *Pharmaceutical Experimental Design And Interpretation*, UK: Taylor & Francis Group, 2006.
- [75] «Nist Sematech,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri554.htm>. [Πρόσβαση 15 3 2016].

- [76] R. J. Martin, M. Bursnall και E. Stillman, «Efficient designs for constrained mixture experiments,» *Statistics and Computing*, τόμ. 9, pp. 229-237, 1999.
- [77] United States Pharmacopoeia Commission, United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 32-NF 27), Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009.
- [78] C. Huabing, C. Xueling, W. Ting, Z. Xiaozhi, G. Zhonghong, Y. Yajiang, X. Huibi και Y. Xiangliang, «A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide,» *Journal of Controlled Release*, τόμ. 98, αρ. 3, p. 427 – 436, 2004.
- [79] Z. Rahman, X. Xu, U. Katragadda, Y. S. R. Krishnaiah, L. Yu και M. A. Khan, «Quality by Design Approach for Understanding the Critical Quality Attributes of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion,» *Molecular Pharmaceutics*, τόμ. 11, αρ. 3, pp. 787 - 799, 2014.
- [80] D. J. McClements, «Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, τόμ. 47, αρ. 7, pp. 611-649, 2007.
- [81] L. Gan, Y. Gan, C. Zhu, X. Zhang και J. Zhu, «Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: In vitro and in vivo results,» *International Journal of Pharmaceutics*, τόμ. 365, p. 143 – 149, 2009.
- [82] P. Aksungur, M. Demirbilek, E. B. Denkbaş, J. Vandervoort, A. Ludwig και N. Ünlü, «Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular

drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies,» *Journal of Controlled Release*, τόμ. 151, pp. 286 - 294, 2011.

- [83] P. R. Karn, H. D. Kim, H. Kang, B. K. Sun, S. E. Jin και S. J. Hwang, «Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion,» *International Journal of Nanomedicine*, τόμ. 8, αρ. 9, pp. 3791 - 3800, 2014.

Παράρτημα Α

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1: Κυκλοσπορίνη Α	14
Σχήμα 2: Δομή δακρυϊκού συστήματος.....	17
Σχήμα 3: Φλεγμονώδεις μεσολαβητές στην Ξηροφθαλμία και στόχοι αντιφλεγμονώδους θεραπείας με κυκλοσπορίνη [15].	18
Σχήμα 4: Δομή ο/w μικρογαλακτωμάτων [50]	27
Σχήμα 5: Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης της ελεύθερης ενέργειας των κολλοειδών συστημάτων σε σχέση με την κατάσταση διαχωρισμού των φάσεων. Οι δύο καταστάσεις χωρίζονται από μια ενέργεια ενεργοποίησης ΔG^* [50]	31
Σχήμα 6: Τύποι μικρογαλακτωμάτων κατά Winsor [54].	33
Σχήμα 7: Η επίδραση του packing parameter στο σχήμα του επιφανειοδραστικού και οι δομές που δημιουργούνται για την κάθε τιμή του [58]	36
Σχήμα 8: Επίδραση της μοριακής γεωμετρίας και των συνθηκών του συστήματος στον packing parameter και στην τιμή HLB [61]	37
Σχήμα 9: Παράδειγμα τριαδικού διαγράμματος φάσεων [51].	43
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση της Διεργασίας	44
Σχήμα 11: Simplex σχεδιασμός	50
Σχήμα 12: Τριαδικό διάγραμμα	50
Σχήμα 13: Μίγμα με συνεχή κατώτερα όρια	51
Σχήμα 14: Διάταξη τιτλοδότησης	65

Σχήμα 15: Γραφική απεικόνιση πειραματικού χώρου	67
Σχήμα 16: Τυπικό κύτταρο διάχυσης	73
Σχήμα 17: Απεικόνιση χρωματογραφήματος προτύπου διαλύματος κυκλοσπορίνης 10μg/mL.....	76
Σχήμα 18 Απεικόνιση χρωματογραφήματος τυφλού γαλακτώματος	77

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κυκλοσπορίνης	15
Πίνακας 2: Ποσοτική σύσταση εμπορικού προϊόντος Restasis [23]	21
Πίνακας 3: Ποσοτική σύσταση εμπορικού προϊόντος Ikervis [24]	22
Πίνακας 4: Υγρά Οφθαλμικά συστήματα χορήγησης Κυκλοσπορίνης Α.....	24
Πίνακας 5: Ποιοτική επίδραση διάφορων μεταβλητών στις φάσεις των μικρογαλακτωμάτων	34
Πίνακας 6: Έκδοχα που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό οφθαλμικών γαλακτωμάτων [63].....	42
Πίνακας 7: Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης.....	61
Πίνακας 8: Σύσταση συνταγών σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό	67
Πίνακας 9: Σύσταση πρότυπου γαλακτώματος (Restasis) [23].....	69
Πίνακας 10: Διαλυτότητα κορεσμού της κυκλοσπορίνης στα διάφορα έλαια φορείς	78
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού κυκλοσπορίνης	83

Πίνακας 12: Μετρήσεις κατανομής μεγέθους σταγονιδίων και ζ-δυναμικού	84
Πίνακας 13: Επιλογή κατάλληλου μοντέλου και ανάλυση διασποράς (ANOVA) για τις δύο αποκρίσεις.....	93
Πίνακας 14: Ανάλυση διασποράς (ANOVA) για το γραμμικό μοντέλο της απόκρισης Dh	95
Πίνακας 15: Βελτιστοποίηση μοντέλου	101

Περιεχόμενα Γραφημάτων

Γράφημα 1: Καμπύλη Αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων κυκλοσπορίνης	63
Γράφημα 2: Διαλυτότητα κορεσμού.....	78
Γράφημα 3: Τριαδικά διαγράμματα φάσης για το σύστημα MCT-Kolliphor HS 15-Νερό (αριστερά) και το σύστημα Castor Oil-Kolliphor HS 15-Νερό (δεξιά)	80
Γράφημα 4: Τριαδικό διάγραμμα φάσης για το σύστημα MCT-Smix-Νερό (πάνω αριστερά), Castor Oil- Smix –Νερό (πάνω δεξιά) και Corn Oil- Smix –Νερό (κάτω)	81
Γράφημα 5: Μελέτη σταθερότητας για την απόκριση Dh.....	89
Γράφημα 6: Ποσότητα της κυκλοσπορίνης ανά μονάδα επιφανείας (Q) για το χρονικό διάστημα των 9 ωρών	91
Γράφημα 7: Ποσότητα της κυκλοσπορίνης ανά μονάδα επιφανείας (Q) για τη χρονική στιγμή t=6h	92
Γράφημα 8: Συσχέτιση προβλεπόμενων τιμών με πραγματικές για την απόκριση Dh....	95
Γράφημα 9: Επίδραση των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Dh	96

Γράφημα 10: Απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Dh.....	97
Γράφημα 11 Επίδραση των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q.....	98
Γράφημα 12: Απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q.....	99
Γράφημα 13: Τρισδιάστατη απεικόνιση της συμμετοχής των συστατικών του μίγματος στην απόκριση Q	100

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Εμπορικά οφθαλμικά σκευάσματα κυκλοσπορίνης Restasis® (Αριστερά) και Ikervis® (Δεξιά)	23
Εικόνα 2: Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων	70
Εικόνα 3: Τα δείγματα 12, 9, 7, 6 και 3 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας	85
Εικόνα 4: : Τα δείγματα 10, 2 και, 4 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας	86
Εικόνα 5: Τα δείγματα 8, 5, 1 και 11 με φθίνουσα σειρά διαφάνειας	86

Παράρτημα Β

Μελέτη Σταθερότητας

α/α	d0		d7		d14		d21		d28	
	Dh (nm)	Pd.i	Dh (nm)	Pd.i	Dh (nm)	Pd.i	Dh (nm)	Pd.i	Dh (nm)	Pd.i
1	302.5 ± 6.0	0.487 ± 0.143	296.2 ± 8.6	0.481 ± 0.084	324.6 ± 2.4	0.255 ± 0.192	329.0 ± 2.5	0.290 ± 0.291	287.4 ± 4.1	0.472 ± 0.144
2	59.8 ± 1.2	0.248 ± 0.010	59.8 ± 1.4	0.244 ± 0.014	59.4 ± 1.1	0.249 ± 0.011	59.0 ± 0.9	0.246 ± 0.004	60 ± 1.7	0.254 ± 0.004
3	31.8 ± 0.8	0.091 ± 0.023	32.5 ± 0.5	0.120 ± 0.004	31.6 ± 0.6	0.094 ± 0.007	31.6 ± 0.7	0.124 ± 0.001	31.9 ± 0.8	0.126 ± 0.011
4	81.9 ± 1.6	0.306 ± 0.002	82.2 ± 1.6	0.305 ± 0.006	81.3 ± 2.3	0.309 ± 0.003	81.7 ± 1.6	0.326 ± 0.002	82.5 ± 2.6	0.325 ± 0.004
5	202.8 ± 5.0	0.303 ± 0.057	200.7 ± 4.4	0.258 ± 0.106	197.4 ± 2.0	0.280 ± 0.110	204.2 ± 1.8	0.284 ± 0.185	196.7 ± 2.2	0.247 ± 0.114
6	27.9 ± 0.8	0.148 ± 0.013	30.4 ± 3.7	0.274 ± 0.107	27.5 ± 0.7	0.181 ± 0.014	28.6 ± 0.6	0.230 ± 0.003	26.9 ± 1.1	0.181 ± 0.010
7	31.1 ± 0.7	0.190 ± 0.007	31.7 ± 1.0	0.251 ± 0.006	30.0 ± 0.6	0.209 ± 0.013	30.0 ± 0.7	0.197 ± 0.015	30.2 ± 0.8	0.206 ± 0.007
8	126.6 ± 2.9	0.171 ± 0.040	126.6 ± 3.0	0.170 ± 0.047	125.7 ± 2.7	0.193 ± 0.025	124.3 ± 2.3	0.195 ± 0.012	127.4 ± 5.4	0.179 ± 0.026
9	28.6 ± 1.0	0.087 ± 0.029	29.1 ± 0.6	0.194 ± 0.005	29.5 ± 0.6	0.189 ± 0.009	32.3 ± 0.5	0.274 ± 0.005	33.1 ± 1.1	0.303 ± 0.005
10	54.2 ± 1.7	0.113 ± 0.016	58.5 ± 3.6	0.145 ± 0.016	53.9 ± 0.9	0.127 ± 0.012	53.9 ± 0.6	0.153 ± 0.005	54.2 ± 1.3	0.139 ± 0.005
11	802.2 ± 16.8	1.000								
12	20.0 ± 0.4	0.294 ± 0.056	17.4 ± 0.4	0.050 ± 0.019	22.0 ± 0.9	0.311 ± 0.031	17.3 ± 0.4	0.023 ± 0.023	18.2 ± 0.2	0.172 ± 0.005
Restasis	965.8 ± 109.3	0.822 ± 0.246								

In vitro Αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης

Time (h)	Run 12	SD	%RSD	Run 9	SD	%RSD	Run 10	SD	%RSD	Run 5	SD	%RSD	Run 1	SD	%RSD	Run 11	SD	%RSD
1	22.95	1.65	7.17	20.61	4.81	23.33	14.21	14.21	6777.75	14.33	1.55	10.85	8.23	5.56	67.58	12.27	3.02	24.59
2	33.93	3.68	10.85	36.43	5.83	16.01	24.91	24.91	132.48	25.12	3.34	13.28	16.10	2.96	18.38	18.26	2.45	13.43
3	76.15	8.86	11.64	64.10	5.08	7.93	66.60	66.60	91.89	59.98	7.49	12.50	46.28	6.94	14.99	47.42	5.11	10.78
4	106.91	4.81	4.50	95.71	8.98	9.38	100.48	100.48	119.29	91.10	10.09	11.07	63.21	13.00	20.57	86.88	19.13	22.02
5	133.31	34.89	26.17	113.31	3.87	3.42	105.27	105.27	138.62	96.27	6.88	7.15	77.77	10.31	13.26	84.26	12.12	14.38
6	140.54	2.23	1.59	131.83	3.49	2.65	122.77	8.81	105.73	109.81	7.81	7.11	88.38	12.08	13.67	94.41	18.25	19.33
7	162.16	3.54	2.18	159.18	7.63	4.79	140.76	140.76	108.51	127.95	0.23	0.18	104.05	16.43	15.79	115.60	19.97	17.28
9	210.37	3.24	1.54	201.46	4.44	2.20	184.93	184.93	109.42	173.54	20.92	12.05	136.66	16.02	11.72	147.31	25.57	17.36

Time (h)	Run 6	SD	%RSD	Run 7	SD	%RSD	Run 3	SD	%RSD	Run 2	SD	%RSD	Run 8	SD	%RSD	Run 4	SD	%RSD	Restasis	SD	%RSD
1	7.93	1.95	24.55	3.27	1.48	45.31	1.05	1.22	116.34	0.22	0.96	433.80	4.84	5.75	118.78	3.01	1.60	53.11	22.88	0.95	4.17
2	53.95	5.00	9.27	41.43	3.29	7.94	35.52	5.04	14.18	25.78	4.43	17.20	27.82	1.66	5.98	44.17	4.45	10.07	40.96	1.24	3.02
3	85.83	10.83	12.62	74.64	7.66	10.26	70.11	4.66	6.65	56.61	4.54	8.02	60.05	8.42	14.02	73.00	7.37	10.09	76.42	10.18	13.32
4	105.45	8.44	8.00	90.55	6.33	6.99	83.67	5.64	6.74	80.70	4.66	5.77	71.30	14.67	20.58	86.48	11.86	13.71	135.22	20.56	15.20
5	113.47	2.92	2.58	102.64	10.72	10.44	101.51	4.06	4.00	91.21	7.30	8.01	124.61	58.01	46.55	122.21	26.44	21.63	156.03	5.78	3.71
6	134.92	4.14	3.07	129.41	8.68	6.71	116.84	3.44	2.95	105.95	10.88	10.27	106.39	11.50	29.60	124.76	18.84	15.10	184.69	2.54	1.37
7	157.09	7.03	4.48	146.73	10.98	7.48	133.37	5.62	4.21	120.16	13.36	11.12	120.35	40.38	33.55	143.06	18.66	13.04	222.01	15.31	6.89
9	203.99	8.73	4.28	190.40	5.65	2.97	172.47	9.56	5.54	162.47	15.96	9.83	143.51	55.95	38.99	182.37	24.31	13.33	270.04	22.57	8.36

Περίληψη

Το σύνδρομο της Ξηροφθαλμίας οφείλεται στην μεταβολή της ποιότητας ή της ποσότητας των δακρύων που καλύπτουν τον κερατοειδή με αποτέλεσμα την ανεπαρκή λίπανση της πρόσθιας επιφάνειας του. Συνοδεύεται από αυξημένη ωσμωτικότητα της δακρυϊκής μεμβράνης και φλεγμονή της οφθαλμικής επιφάνειας. Τα σκευάσματα κυκλοσπορίνης αποτελούν συχνή θεραπεία καθότι δρουν ενάντια στη φλεγμονή της οφθαλμικής κοιλότητας, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής δακρύων και της διεύρυνσης των αγγείων του επιπεφυκότα.

Λόγω της εξαιρετικά χαμηλής διαλυτότητας της Κυκλοσπορίνης σε υδατικά μέσα έχουν γίνει πολλές ερευνητικές προσπάθειες για την δημιουργία ενός κατάλληλου οφθαλμικού συστήματος χορήγησής της. Τα γαλακτώματα πλεονεκτούν έναντι των υπόλοιπων φαρμακοτεχνικών μορφών καθότι έχουν σχετικά οικονομική και απλή παραγωγή και αποστείρωση. Ιδιαίτερος τα γαλακτώματα με μέγεθος σταγονιδίων μικρότερων των 100nm αποτελούν σταθερότερα συστήματα, με μεγάλη διάρκεια ζωής και σκεδάζουν ασθενώς τα κύματα φωτός, έτσι είναι οπτικά διαυγή ή ελαφρώς θολά.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μορφοποίηση και η αξιολόγηση ενός σκευάσματος κυκλοσπορίνης Α κατάλληλο για οφθαλμική χρήση. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν γαλακτώματα από εγκεκριμένα και ασφαλή έκδοχα τα οποία περιείχαν στην εσωτερική ελαιώδη φάση τους διαλυμένη τη θεραπευτική δόση 0.05%w/w κυκλοσπορίνης Α. Ένα επιπλέον επιθυμητό χαρακτηριστικό των γαλακτωμάτων αυτών ήταν η μείωση των σταγονιδίων της εσωτερικής τους φάσης σε μεγέθη μικρότερα των 100 nm.

Για την ανάπτυξη και την αξιολόγηση των γαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Πειραματικού Σχεδιασμού. Αναλυτικότερα επιλέχθηκε ο Σχεδιασμός Μίγματος υπό περιορισμούς με παράγοντες την % αναλογία των ελαίων Castor Oil και MCT καθώς και του επιφανειοδραστικού Kolliphor HS 15. Για την επιλογή των παραγόντων αυτών πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα υπολογισμού της διαλυτότητας κορεσμού της κυκλοσπορίνης σε διάφορα έλαια καθώς και η κατασκευή τριγωνικών διαγραμμάτων φάσης

για τον προσδιορισμό της περιοχής ύπαρξης μικρογαλακτώματος με τη μέθοδο της τιτλοδότησης. Τα όρια των παραγόντων επιλέχθηκαν με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα και τις συνήθειες αναλογίες που ορίζονται από τη βιβλιογραφία για την παρασκευή οφθαλμικών γαλακτωμάτων o/w. Η μήτρα του πειραματικού σχεδιασμού αποτελούνταν από 12 συνταγές, η μία εκ των οποίων ήταν επανάληψη.

Έντεκα από τα δώδεκα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν παρουσίασαν μακροσκοπική σταθερότητα για διάστημα τριών μηνών από την ημερομηνία παρασκευής τους και σταθερές τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου στον ένα μήνα τον οποίον μετρήθηκαν. Επιπλέον όλες οι συνταγές περιείχαν ποσότητα κυκλοσπορίνης εντός των ορίων που ορίζει η Φαρμακοποιία.

Ακολούθησε η *in vitro* αξιολόγηση των συνταγών με δύο μεθόδους οι οποίες αποτέλεσαν και τις υπό μελέτη αποκρίσεις του πειραματικού σχεδιασμού. Μετρήθηκε η υδροδυναμική διάμετρος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης των γαλακτωμάτων (D_h), η οποία επιλέχθηκε σαν πρώτη απόκριση. Το μοντέλο που επιλέχθηκε για την ανάλυση των δεδομένων αυτής της απόκρισης ήταν γραμμικό. Ο παράγοντας που είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ήταν το επιφανειοδραστικό, όπου με την αύξηση του ευνοούσε την μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ένα *in vitro* πείραμα διάχυσης μέσω τεχνητής μεμβράνης κυτταρίνης για τη συγκριτική μελέτη της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης από τα γαλακτώματα. Το πείραμα εκτελέστηκε με τη χρήση τροποποιημένων κυττάρων Franz και η απόκριση που επιλέχθηκε να μελετηθεί ήταν η ποσότητα της κυκλοσπορίνης που διαπερνούσε την μεμβράνη ανά μονάδα επιφανείας (Q) στις 6h από την έναρξη του πειράματος. Το μοντέλο που προσομοιάζει βέλτιστα την σχέση παραγόντων-απόκρισης ήταν το Special Cubic. Για την αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης εξίσου σημαντική επίδραση είχαν το έλαιο Castor Oil και το επιφανειοδραστικό Kolliphor HS15. Με την αύξηση του ελαίου η αποδέσμευση της κυκλοσπορίνης μειωνόταν ενώ η επίδραση του επιφανειοδραστικού ήταν η αντίστροφη.

Συνεπώς για η αύξηση της αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης ευνοείται με την μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης του γαλακτώματος, φαινόμενο το οποίο αυτό πιθανώς οφείλεται στην αύξηση της επιφάνεια αποδέσμευσης της κυκλοσπορίνης. Το γαλάκτωμα με τη μέγιστη ποσότητα επιφανειοδραστικού και την ελάχιστη ποσότητα ελαίων είχε λοιπόν τα βέλτιστα χαρακτηριστικά, δηλαδή το μικρότερο D_h και τη μεγαλύτερη αποδέσμευση.

Λέξεις κλειδιά: Ξηροφθαλμία, Κυκλοσπορίνη A, Μικρογαλάκτωμα, Πειραματικός Σχεδιασμός, in vitro αποδέσμευση

Abstract

The Dry Eye Syndrome (DES) is caused by the alteration of the amount or quality of the lacrimal fluid resulting in the insufficient lubrication of the front surface of the cornea. It is accompanied by increased osmolality of the tear film and inflammation of the ocular surface. Cyclosporine containing formulations is an option for the treatment of DES, as it acts against inflammation of the ocular cavity, resulting in the increase of the production of tears, and the expansion of the conjunctival blood vessels

Due to the extremely low solubility of cyclosporine in aqueous media there have been many research efforts in order to create a satisfactory ophthalmic delivery system. Emulsions have many advantages over other formulations as they are relatively inexpensive and simple to manufacture and sterilize. Particularly submicron emulsions are sufficiently stable systems. Moreover they are optically clear or slightly turbid liquids as they contain droplets that scatter light waves weakly.

The objective of the present study was the formulation and evaluation of a cyclosporine A formulation suitable for ophthalmic use. For this purpose, ophthalmic emulsions consisting of approved and safe for the eye excipients were prepared. The internal oil phase of the emulsions contained dissolved cyclosporine A with a therapeutic dose of 0.05% w/w. A further desirable characteristic of these emulsions was the reduction of droplets of the internal phase in sizes smaller than 100 nm.

The development and the evaluation of the emulsions was performed using Design of Experiment (DoE) technique. More specifically the type of the Experimental Design chosen was the Constrained Mixture Design and the factors studied where the % proportion of Castor Oil and Medium Chain Triglycerides and of the surfactant Kolliphor HS 15. Preliminary experiments were conducted in order to determine cyclosporine's saturation solubility in different oils. Also ternary phase diagrams were constructed using the titration method proving the area of microemulsion's existence. The results of the preliminary experiments were taken in to consideration for the selection of the DoE factors. The limits of the factors were selected based on preliminary experiments and the % amounts appeared

in the literature for the preparation of ophthalmic o/w emulsions. The matrix of the experimental design consisted of 12 formulations, one of which was a repetition.

Eleven of the twelve emulsions prepared were macroscopically stable for three months from the date of manufacture. Furthermore, the hydrodynamic diameter and the polydispersity index remained unchanged during the one month in which they were measured. Moreover, all formulations contained cyclosporine within the limits set by the Pharmacopoeia.

In vitro evaluation of the formulations was performed measuring two responses. The first was the hydrodynamic diameter of the emulsion's inner phase droplets (Dh). The model chosen for the analysis of the data was linear. The factor which had a statistically significant effect was the % amount of the surfactant, since the increase of the surfactant resulted in the decrease of the hydrodynamic diameter.

The second response was the amount of cyclosporine permeated the membrane per unit area after 6 hours (Q). An in vitro diffusion experiment was performed, using artificial cellulose membrane for the comparative study of cyclosporine's release from the emulsions. The experiment was performed using modified Franz cells. It was found that the Special Cubic model simulates the relation of Q and the factors selected. In the release of cyclosporine two factors had equal significant effect, the oil Castor Oil and the surfactant Kolliphor HS15. By increasing the amount of the oil the cyclosporine's release was decreased while the effect of the surfactant was the opposite.

In conclusion, the increase of cyclosporine's release is favored by the reduction in the hydrodynamic diameter of the droplets of the emulsion's inner phase, a phenomenon that is probably due to the increase of cyclosporine's release surface. So the emulsion with the maximum amount of surfactant and the minimum amount of oil had the best characteristics, i.e. the smallest Dh and greater release.

Key words: Dry Eye Syndrome, Cyclosporine A, Microemulsion, Design of Experiment, in vitro release