UMOR ACQUEO ARTIFICIALE COME STANDARD PER L'ANALISI CROMATOGRAFICA DELLA PENETRAZIONE DI FARMACI IN CAMERA ANTERIORE

Giorgio SANGALLI[3], Angelo MACRÌ[1,2], Valeria MARINI[3], Francesca MATTIOLI[3], Michele IESTER[2]

[1]IRCSS - Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova
[2]DINOGMI - Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia, Genetica e Materno-Infantile dell'Università degli studi di Genova, Genova
[3]Sezione di Farmacologia e Tossicologia Clinica del Di.M.I. dell'Università degli Studi di Genova, Genova

ABSTRACT

Purpose: Aim of the study was to make a model of artificial aqueous humor to be used as a standard matrix for HPLC chromatography analyses of drug concentration in anterior chamber.
Methods: To explain how the artificial aqueous humor has been generated, our artificial aqueous humor was compared with the one obtained from 15 eyes immediately before cataract surgery.
In both aqueous humors we have performed a HPLC analyse of Bromfenac, Nepafenac, Moxifloxacin, Azithromycin and Phenylephrine. Thanks to the matrix, it was possible to acquire a naive aqueous humor in which external drugs or substances were absent.
Results: No significant differences between the two groups examined with HPLC were found.
Conclusion: The artificial aqueous humor that we have obtained in vitro can be used as a standard control anytime systemic or topical drug adsorption in anterior chamber is studied.

Ottica fisiopat 2013; XVIII: 31-38

INTRODUZIONE E OBIETTIVI

L'umor acqueo è un liquido trasparente e incolore che riempie la camera anteriore e la camera posteriore del bulbo oculare. Viene secreto dai corpi ciliari in camera posteriore a una velocità di 2,2 mm^3/minuto[1] e da qui raggiunge la camera anteriore attraverso la pupilla; viene successivamente drenato a livello dell'angolo irido-corneale attraverso il trabecolato, il canale di Schlemm, le vene acquose e le vene episclerali.
Tra le sue funzioni, l'umor acqueo partecipa al metabolismo del bulbo apportando elementi nutritivi ed eliminando residui metabolici.
Con un volume di circa 300 mm^3, l'umor acqueo costituisce il 3% del volume totale del bulbo e si dispone per 4/5 in camera anteriore e per 1/5 in camera posteriore[2]. Ha un peso specifico di 1,0059 e una viscosità di 1,025[3], inferiore a quella plasmatica e molto simile a quella dell'acqua.
L'indice di rifrazione è di 1,336 e il pH è leggermente più acido rispetto al plasma, con un valore di 7,21[4]. Come altri fluidi interstiziali, è composto essenzialmente da acqua, che ne rappresenta il 98,75%[5], in cui sono disciolte numerose sostanze.
Le proteine, di provenienza ematica, raggiungono l'umor acqueo attraversando una barriera rappresentata dalla parete dei capillari e dall'epitelio del corpo ciliare e sono presenti in concentrazione inferiore a quella plasmatica (0,013 g/dl vs 7,5 g/dl)[6], mentre possono raggiungere tale quota in corso di alterazioni della barriera emato-retinica, come in caso di patologie traumatiche e flogistiche. Le principali proteine sono così ripartite[7]: 78% albumina; 3,4%

AUTORE CORRISPONDENTE
Angelo Macrì
Via San Luca di Albaro 37/1
16146 Genova
E-mail
macria70@gmail.com
Cell: 347-2758754

PAROLE CHIAVE:
umor acqueo, cromatografia, HPLC, camera anteriore, bromfenac, nepafenac, fenilefrina, levofloxacina, moxifloxacina.
KEY WORDS:
aqueous humor, chromatography, HPLC, drug adsorption, anterior chamber, bromfenac, nepafenac, phenylephrine, moxifloxacina, levofloxacina.

pre-albumina; 6,9% alfa globuline; 8,9% beta-globuline; 2,8% gamma-globuline.
Tra gli elettroliti, il Na+ è il catione maggiormente rappresentato (330 mg/dl)[8] ed ha una concentrazione superiore a quella plasmatica grazie alla presenza di un sistema di trasporto attivo a livello dell'epitelio ciliare; K+, Ca++ e PO4-- sono a concentrazioni sovrapponibili a quelle del siero[9].
Gli ioni HCO3- sono presenti a concentrazioni variabili, strettamente correlati alla presenza di acido lattico, nei confronti di cui il bicarbonato esplica un potere tampone.
Gli ioni Cl- rappresentano la principale componente anionica e si legano ai principali cationi presenti nell'umor acqueo (Na+, K+, Ca++)[10].
Il glucosio (80 mg/100 ml) ha una concentrazione paragonabile a quella plasmatica, e risulta aumentato in maniera proporzionale a quanto avviene nel plasma in corso di diabete mellito[11].
L'urea è presente a una concentrazione di 10 mg/100 ml[12], leggermente inferiore a quella del plasma. L'acido lattico, in quantità di 28 mg/100 ml[13], deriva dalla degradazione del glucosio da parte dei corpi ciliari e viene accumulato in camera anteriore a una concentrazione maggiore rispetto a quella plasmatica.
L'acido ascorbico, presente in quantità di 15 mg/100 ml, ossia dieci volte più elevata rispetto al sangue, svolge un'importante funzione antiossidante volta a proteggere l'epitelio lenticolare dai danni indotti dalle radiazioni luminose ultraviolette[14].

Da un punto di vista farmacologico, l'umor acqueo rappresenta un sito raggiungibile attraverso la cornea mediante l'applicazione di preparazioni oftalmiche, oppure attraverso la barriera emato-oculare da parte di farmaci somministrati per via sistemica.
La valutazione dell'assorbimento dei farmaci a livello oculare, siano essi somministrati per via topica o per via sistemica, si basa sulla misurazione della concentrazione dei livelli di farmaco attivo, o dei suoi metaboliti, in camera anteriore, all'interno dell'umor acqueo.
In seguito a somministrazione di un farmaco in collirio, la quantità di farmaco assorbita a livello corneale è variabile e dipende da diversi fattori, come il pH e l'osmolarità della formulazione utilizzata, il possibile legame con le proteine presenti nel film lacrimale e la presenza di lesioni corneali[15].
Tra le metodiche in uso per la misurazione di componenti endogeni ed esogeni all'interno dell'umor acqueo, una delle tecniche più evolute in ambito oftalmologico è la cromatografia[16-17]. Introdotta nel 1906 dal chimico italo-russo Mikhail Tswett[18] per separare i pigmenti contenuti nelle foglie di alcune piante, essa è nata come una tecnica di separazione, basata sulla diversa velocità di migrazione con cui più sostanze depositate su un supporto adatto vengono trasportate da un fluido, detto eluente, e si stratificano in posizioni differenti del supporto.
Gli sviluppi recenti della cromatografia fanno oggi di questa tecnica uno dei procedimenti analitici di maggior

interesse in molti campi della ricerca scientifica e tecnologica[19].
Per calcolare le concentrazioni dei farmaci attivi in camera anteriore, l'ostacolo principale è rappresentato dalla necessità di ottenere un campione di umor acqueo mediante paracentesi della camera anteriore, manovra invasiva che può essere applicata solo in occasione di interventi chirurgici sul segmento anteriore dell'occhio. Risulta pertanto di fondamentale importanza poter disporre di una matrice standard di umor acqueo artificiale, ricreato in vitro rispettando le principali caratteristiche fisico-chimiche dell'umor acqueo naturale.
L'obiettivo di questo studio è stato quindi quello di ricreare una matrice artificiale di umor acqueo da utilizzare come riferimento negli studi cromatografici in HPLC. Al fine di valutare l'applicabilità del metodo alla misurazione delle concentrazioni di farmaci oftalmologici in camera anteriore, l'umore acqueo artificiale è stato confrontato con quello ottenuto da pazienti sottoposti a intervento di cataratta, dopo l'aggiunta a entrambi di concentrazioni note di farmaci di maggior impiego nella pratica clinica.

METODOLOGIA

Sostanze chimiche

Tutti i reagenti utilizzati per la preparazione dell'umore acqueo artificiale (NaCl, KCl, CaCl2, NaHCO3, Na-lattato, Na-ascorbato, glucosio, urea e albumina) sono stati acquistati dalle ditte Merck (Darmstadt, Germania) e Sigma Aldrich (Milano, Italia).
Tutti i reagenti utilizzati per la metodica HPLC (acqua, tetraidrofurano, sodio acetato e acetonitrile) sono ultrapuri specifici per HPLC delle ditte Merck (Darmstadt, Germania) e Millipore S.p.A. (Milano, Italia).
I farmaci testati per la conduzione dello studio erano tutti colliri in formulazione commerciale: Bromfenac 0,9 mg/ml, Nepafenac 1 mg/ml, Levofloxacina 5 mg/ml, Moxifloxacina 5 mg/ml, Fenilefrina 10%.

Preparazione dell'umore acqueo artificiale

L'umore acqueo artificiale è stato preparato sciogliendo in acqua: NaCl 6,19 g/L, KCl 0,39 g/L, CaCl2 0,28 g/L, NaHCO3 2,90 g/L, Na-lattato 0,28 g/L, Na-ascorbato 0,15 g/l, glucosio 0,80 g/L, urea 0,10 g/L, albumina 0,10 g/L. Le sostanze sono state aggiunte alla soluzione a una a una in agitazione costante a temperatura ambiente, secondo l'ordine sopraindicato, lasciando come ultimi Na-lattato e Na-ascorbato. Il pH della soluzione è stato portato a 7,21 aggiungendo qualche goccia di HCl. L'umore acqueo così preparato è stato filtrato e conservato a - 20°C fino al momento dell'analisi.

Pazienti

I campioni di umore acqueo sono stati raccolti da 15 pazienti di entrambi i sessi immediatamente prima dell' intervento programmato di cataratta. Come previsto dal normale iter clinico e secondo corrente pratica clinica, tutti i pazienti sono stati trattati, solo per via locale e non per via sistemica, con farmaci

antiinfiammatori, antibiotici, midriatici e anestetici locali; i principali farmaci utilizzati comunemente nell'intervento di cataratta presso i reparti U.O. Divisione Oculistica dell'Ospedale San Martino di Genova e la Clinica Oculistica dell'Università di Genova (DINOGMI - Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia, Genetica e Materno-Infantile dell'Università degli studi di Genova) sono: bromfenac, nepafenac, levofloxacina, moxifloxacina, fenilefrina, lidocaina e iodio-povidone per la disinfezione della cute.
Immediatamente prima dell'intervento di cataratta, già in sala operatoria, venivano prelevati, con ago cannula da 36 gauge sterile, circa 0.1 ml di umor acqueo.
L'umor acqueo così raccolto è stato immediatamente trasferito al laboratorio e conservato a -80 C° fino al momento dell'analisi. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS - Azienda Ospedaliera San Martino e IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro.
Il consenso informato firmato è stato ottenuto da ciascun paziente prima dell'arruolamento nello studio.

Preparazione dei campioni

Per la valutazione cromatografica di confronto tra umore acqueo artificiale e umore acqueo dei pazienti, tra i farmaci impiegati negli interventi di cataratta sono stati scelti: bromfenac, nepafenac, levofloxacina, moxifloxacina e fenilefrina.
Le preparazioni commerciali sono state opportunamente diluite al fine di ottenere una concentrazione finale, nell'umore acqueo artificiale e in quello dei pazienti, di 10 µg/ml. Ciascun farmaco è stato analizzato in triplo, preparando tre diverse diluizioni.

Condizioni cromatografiche

L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando un apparato HPLC Kontron modello 325, con pompa a bassa pressione, connesso ad un rilevatore spettrofotometrico selezionato alla lunghezza d'onda di 270 nm. L'analisi dei risultati è stata effettuata mediante software di integrazione Kroma System 2000 (Bio-Tek Instruments, Milano, Italia).
La separazione cromatografica è stata realizzata con tecnica isocratica mediante colonna C18 Purosphere RP-18 E 125 mm x 4,6 mm (Merck KGaA Darmstadt Germany) corredata di un'idonea pre-colonna.
Per la determinazione di bromfenac, nepafenac e fenilefrina è stata allestita una fase mobile composta da 25% acetonitrile e da 75% tetraidrofurano/ sodio acetato 50mM (10:90 v/v), pH 6,5; per la determinazione di levofloxacina e moxifloxacina è stata utilizzata la stessa fase mobile variando la percentuale di solventi (acetonitrile 15%: tetaridrofurano/sodio acetato 85%). La velocità di flusso nelle condizioni di lavoro era di 1 ml/min a temperatura ambiente. Il tempo totale della corsa cromatografica era di 10 minuti.
I campioni di umore acqueo artificiale e dei pazienti sono stati iniettati direttamente nel sistema cromatografico senza una precedente procedura di estrazione; il volume iniettato era pari a 50 µl corrispondenti al carico massimo del "loop" dell'iniettore Rheodyne mod. 7125 utilizzato.

fig. 1

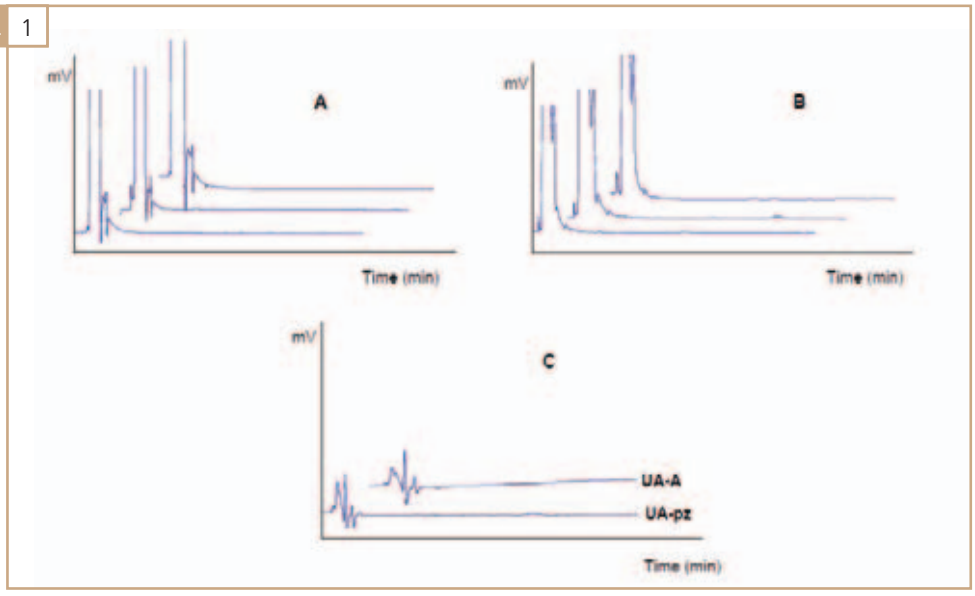

fig. 1
Cromatogrammi esemplificativi di Umore acqueo artificiale (A) e Umore acqueo prelevato da tre diversi pazienti (B) con F.M. tetraidrofurano/ sodio acetato 75% - acetonitrile 25%. (C) Umore acqueo artificiale (UA-A) e di un paziente (UA-Pz) con F.M. tetraidrofurano/ sodio acetato 85% - acetonitrile 15%.

RISULTATI

L'umore acqueo, prelevato nei 15 pazienti arruolati nello studio, è stato estratto a 30-60 minuti prima dell'inizio dell'intervento di cataratta; il volume medio di umore acqueo recuperato era di 75 ± 10 µl per paziente; l'età media dei pazienti era di 75 ± 6 anni; tra di essi, 9 erano femmine e 6 maschi.
L'analisi dell'umore acqueo è stata condotta confrontando i cromatogrammi di tre campioni indipendenti di umore acqueo artificiale e dei pazienti, alla lunghezza d'onda di 270 nm, scelta sulla base delle caratteristiche spettrofotometriche dei farmaci testati (Fig 1). L'analisi non ha evidenziato sostanziali differenze cromatografiche tra l'umore acqueo artificiale e quello dei pazienti; la modesta variabilità dell'aspetto cromatografico può essere attribuita alla probabile presenza nei campioni di umore acqueo dei pazienti, di tracce dei farmaci comunque loro somministrati nel periodo pre-operatorio.
Le figure 2 e 3 riportano i cromatogrammi esemplificativi di umore acqueo artificiale e quello dei pazienti ai quali sono stati aggiunti bromfenac, nepafenac, fenilefrina, levofloxacina e moxifloxacina, alla concentrazione finale di 10 µg/ml. Nelle diverse condizioni sperimentali utilizzate, non sono stati osservati picchi di interferenza e non sono apprezzabili differenze significative dei tempi di ritenzione dei farmaci testati tra umore acqueo artificiale e quello dei pazienti (Tab. 1). Sebbene il metodo cromatografico scelto possa essere responsabile della bassa ritenzione di levofloxacina e della asimmetria del picco di moxifloxacina (Fig. 3), è comunque dimostrabile anche in questo caso la sostanziale somiglianza dei cromatogrammi di umore acqueo artificiale e quello dei pazienti.

DISCUSSIONE

Lo studio cromatografico di confronto tra umor acqueo artificiale e umor acqueo naturale, mostrato nelle figure 2 e 3, indica che la concentrazione di farmaci misurata nella matrice da noi utilizzata rispecchia in maniera significativa la

fig. 2

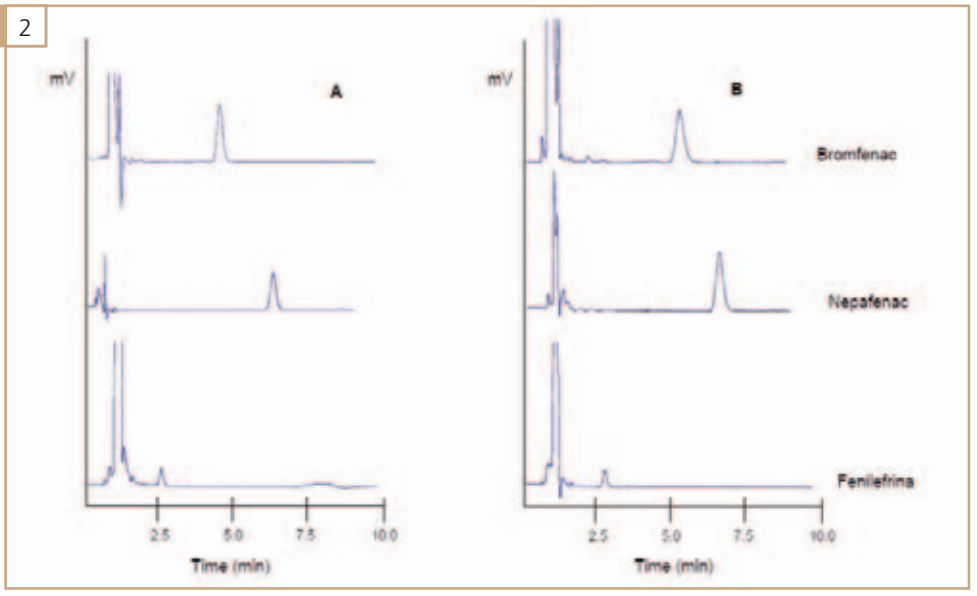

fig. 3

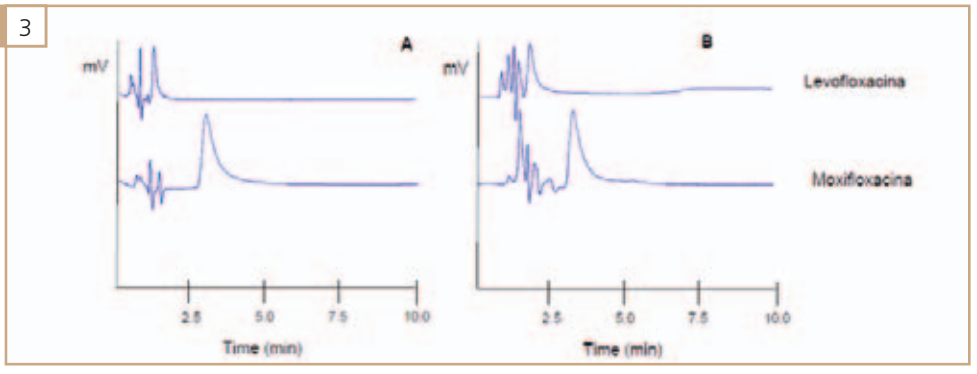

fig. 2 Cromatogrammi esemplificativi di umore acqueo artificiale (A) e umore acqueo prelevato da tre diversi pazienti (B) dopo l'aggiunta dei farmaci indicati, alla concentrazione finale di 10 ug/ml. F.M. tetraidrofurano/ sodio acetato 75% - acetonitrile 25%.

fig. 3 Cromatogrammi esemplificativi di umore acqueo artificiale (A) e umore acqueo prelevato da due diversi pazienti (B) dopo l'aggiunta dei farmaci indicati, alla concentrazione finale di 10 ug/ml. F.M. tetraidrofurano/ sodio acetato 85% - acetonitrile 15%.

concentrazione degli stessi farmaci misurata nell'umor acqueo dei pazienti sottoposti a intervento di cataratta. Questo ci permette di ritenere tale matrice idonea alla valutazione dell'assorbimento corneale dei principali preparati farmacologici usati comunemente negli interventi di cataratta.

L'utilizzo di un umor acqueo artificiale puro in cui, a differenza di quanto si potrebbe osservare nell'umor acqueo naturale, non sono presenti tracce di altri farmaci assunti dal paziente nel periodo pre-operatorio, consente di determinare le caratteristiche cromatografiche "ideali", ossia non influenzate dalla presenza di altre sostanze presenti in camera anteriore.

Come vediamo nella tabella 1, i tempi di ritenzione dei farmaci studiati non differiscono in maniera significativa tra i due campioni di studio a confronto; possiamo quindi rilevare come il peso di eventuali tracce farmacologiche, presenti comunemente in camera anteriore negli umor acquei di pazienti sottoposti a intervento di cataratta, non determini variazioni significative nella valutazione cromatografica dei farmaci usati in questo studio.

Ricreare una matrice di umor acqueo artificiale consente inoltre di superare l'ostacolo principale rappresentato dalla necessità di ottenere campioni di umor acqueo di soggetti sani, mediante paracentesi della camera anteriore, che può essere applicata evidentemente solo in caso di interventi chirurgici in pazienti con patologie oculari.

Tabella 1 **Le medie e le deviazioni standard (d.s.) sono state calcolate su tre campioni per ciascun farmaco**

	UA Artificiale minuti (media ± d.s.)	UA Pazienti minuti (media ± d.s.)
Bromfenac	4.51 ± 0.25	5.30 ± 0.30
Nepafenac	6.88 ± 0.24	6.74 ± 0.29
Tropicamide e Fenilefrina	2.59 ± 0.21	2.75 ± 0.19
Levofloxacina	1.92 ± 0.15	1.97 ± 0.15
Moxifloxacina	3.01 ± 0.25	3.08 ± 0.21

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti con l'analisi cromatografica condotta, suggeriscono che la composizione scelta per l'allestimento di umore acqueo artificiale sia simile a quella dell'umore acqueo umano.
L'assenza di differenze significative riscontrata nell'analisi dei farmaci testati in vitro in umore acqueo artificiale e in umore acqueo di pazienti, permette di poter utilizzare una matrice artificiale come standard di riferimento per la validazione di studi sull'assorbimento in camera anteriore di farmaci somministrati per via topica o per via sistemica.

RIASSUNTO

Obiettivi: proporre un modello di umor acqueo ricreato in vitro da utilizzare come matrice di riferimento per studi cromatografici finalizzati alla misurazione in umor acqueo della concentrazione di farmaci oftalmologici.
Procedure di base: messa a punto di un umore acqueo artificiale e confronto con umore acqueo ottenuto da pazienti operati di cataratta mediante tecnica HPLC. Analisi preliminare di farmaci di impiego oftalmologico.
Risultati: l'analisi cromatografica dell'umore acqueo artificiale è risultata sovrapponibile a quella di umore acqueo prelevato dai pazienti; non sono state evidenziate differenze significative nell'analisi dei farmaci testati in vitro tra umore acqueo artificiale e umore acqueo prelevato dai pazienti.
Conclusioni: ricreare una matrice di umor acqueo in vitro permette di disporre di uno standard di controllo da utilizzare per lo studio dell'assorbimento di farmaci in camera anteriore somministrati per via topica o per via sistemica.

BIBLIOGRAFIA

1. Saraux H, Biais B. Fisiologia dell'umore acqueo e della pressione oculare. In: *Manuale di Fisiologia Oculare*. Masson Italia Editori, 1986: 73
2. Anastasi G. L'occhio. In: *Trattato di Anatomia Umana vol. 3*. Edi-Ermes, 2007: 351
3. Vass C, Hirn C, Richter-Mueksch. *Human aqueous viscosity in cataract, primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation syndrome*. Invest Ophtalmol Vis Sci 45, 2004
4. Veselovsky J, Olah Z, Gressnerova S. *The free amino acids and the aqueous pH after antiglaucomatics in vitro*. Bratisl Lek Listy **104**: 14-18, 2003
5. Duke-Elder S. The Aqueous Humor. In: *System of Ophthalmology*. St. Louis, Mosby, 1968
6. Krause U. *Proteins of the normal human*

aqueous humor. Ophthalmologica **159**: 178, 1969
7. Saraux H, Biais B. Fisiologia dell'umore acqueo e della pressione oculare. In: *Manuale di Fisiologia Oculare*. Masson Italia Editori, 1986: 74
8. Davson H. The aqueous humor and the intraocular pressure. In: *Physiology of the Eye*. Davson H, editor. New York, 1990
9. Cruciani F et al. *Evaluation of five elements in lenses and aqueous humor of experimental rabbits after induced opacity.* J Trace Elem Med Biol **18**: 141-147, 2004
10. Cozzi R et al. Analisi Chimica Moderni Metodi Strumentali. In: T*eoria e Strumentazione*. Zanichelli, 1992
11. Lambert JL. *Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy.* J Biomed Opht 10, 2005
12. Robertson J, Williams P. *The creatinine, sugar, and urea equilibrium between plasma and lymph, aqueous humor, cerebro-spinal fluid, and gastric secretion after a hypertonic injection of these solutions.* J Physiol **95**: 139-147, 1939
13. Dias PL. *Correlation of aqueous humor lactic acid dehydrogenase activity with intraocular pathology.* Br J Ophthalmol **63**: 574-77, 1979
14. Reiss GR, Werness PG, Zollman PE, Brubaker RF. *Ascorbic acid levels in the aqueous humor of nocturnal and diurnal mammals*. Arch Ophthalmol **5**: 753-51, 1986
15. Lee M, Hammarlund ER. *Corneal absorption of ophtalmic drugs.* Journal of Pharmaceutical sciences **5**: 721-24, 1974
16. Zhou L et al. *Determination of voriconazole in acqeous humor by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry.* Journal of Chromatography B **2**: 766, 2002
17. Foti S et al. *Simultaneous quantification of carteolol and dorzolamide in rabbit aqueous humor and ciliar body by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.* Journal of Chromatography B **9**: 878, 2010
18. Tswett M. Physical-chemical studies of chlorophyll adsorption. In: *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft vol. 24* 1906: 316-326.
19. Mentasti E, Saini G. *Analisi Chimica Cromatografica*. Piccin, Nuova Libraria, 1990