

Priprava i karakterizacija nanokristala rebamipida

Franjković, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:582564>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



Filip Franjković

**Priprava i karakterizacija nanokristala
rebamipida**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020 godina.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Pepića.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu Pepiću na stručnom vodstvu i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju jer su bili izrazito pristupačni i u svemu spremni pomoći.

Zahvalnost dugujem i svojoj obitelji koja me je uvijek poticala na mom akademskom putu i bila podrška u ključnim trenucima. Roditeljima zahvaljujem što su mi svojom žrtvom omogućili visoko obrazovanje koje je na kraju ovjenčano ovim radom.

Svim svojim prijateljima i kolegama zahvaljujem jer su bili neizostavni dio moga studiranja i učinili da mi zagrebački studentski dani postanu nezaboravan dio života.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanokristali	2
1.1.1. Svojstva i specifičnosti nanokristala	2
1.1.2. Postupci i metode proizvodnje nanokristala	4
1.1.3. Stabilnost suspenzija nanokristala	8
1.2. Ograničenja oftalmičke primjene lijeka	9
1.3. Primjena nanokristala u oftalmičkim pripravcima	11
1.3.1. Svojstva oftalmičkih pripravaka temeljenih na nanotehnologiji	11
1.3.2. Primjeri nanopripravaka za oftalmičku primjenu	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	18
3.2. Metode	18
3.2.1. Izrada suspenzija rebamipida	18
3.2.2. Priprema za mljevenje i mljevenje uzoraka	18
3.2.3. Određivanje srednjeg promjera čestica rebamipida	20
3.2.4. Termalna analiza čestica rebamipida u čvrstom stanju diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Veličina čestica rebamipida i indeks polidisperznosti	21
4.2. Pretražna diferencijalna kalorimetrija	26
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	32
7. SAŽETAK / SUMMARY	38

1. UVOD

Svakodnevnim napretkom tehnologije i razvojem metoda kemijske sinteze, broj novosintetiziranih djelatnih tvari u stalnom je porastu. Tijekom razvoja nove djelatne tvari iznimno je bitno predviđanje bioraspoloživosti te tvari pri određenom putu primjene. Mora, dakle, biti poznat način i obim apsorpcije lijeka s mjesta primjene u krv i raspodjela do mjesta djelovanja. Putujući do mjesta djelovanja lijek prolazi kroz različite barijere koje odvajaju tjelesne odjeljke (Katzung i sur., 2011). Stoga su djelatne tvari namijenjene za oralnu primjenu klasificirane prema biofarmaceutskom sustavu klasifikacije (*engl. Biopharmaceutics Classification System, BSC*) koji je prvi put objavljen 1995. godine (Amidon i sur., 1995). BCS sustav podrazumijeva klasifikaciju djelatnih tvari u četiri skupine prema njihovoj topljivosti. Tako se u prvoj BCS skupinu ubrajaju dobro topljive i dobro permeabilne djelatne tvari, u drugu BCS skupinu slabo topljive i dobro permeabilne djelatne tvari, u treću BCS skupinu dobro topljive i slabo permeabilne tvari, a u četvrtu BCS skupinu slabo topljive i slabo permeabilne djelatne tvari (Lobenberga i Amidon, 2000).

Za poboljšanje topljivosti slabo topljivih djelatnih tvari koriste se razni farmaceutsko-tehnološki pristupi u izradi formulacije lijeka. Jedan od značajnijih pristupa je smanjenje veličine čestica djelatne tvari mikronizacijom. Iako se tako u određenoj mjeri povećava brzina otapanja teško topljive tvari, često je ograničen utjecaj na bioraspoloživost pa se u novije vrijeme provode postupci nanonizacije u kojima se čestice djelatne tvari smanjuju do nanometarskih veličina. Tako obrađene djelatne tvari nazivaju se nanokristalima (Lovrić i sur., 2015). Primjena djelatne tvari u obliku nanokristala nije ograničena samo na oralnu i parenteralnu primjenu, već je svoju značajnu ulogu ostvarila i u terapijskim pripravcima za oftalmičku primjenu.

Složenost strukture i fiziologije oka predstavlja izazov prilikom izrade odgovarajućih formulacija. Kod oftalmičke primjene problem se javlja kod bioraspoloživosti koja je relativno mala zbog gubitka djelatne tvari s površine oka i slabe permeabilnosti rožnice (Lovrić i sur., 2015). Formulacije s nanočesticama djelatne tvari pokazale su napredak prevladavanjem problema slabo topljivih lijekova i poboljšavanjem bioraspoloživosti. Također, pokazale su se uspješnima u postizanju povećanog vremena zadržavanja i propusnosti lijekova kroz epitel rožnice i očne spojnice (konjunktive) (Sharma i sur., 2016). Stoga se stalno poduzimaju daljnja istraživanja kako bi se poboljšao učinak lijekova za oftalmičku primjenu.

1.1. NANOKRISTALI

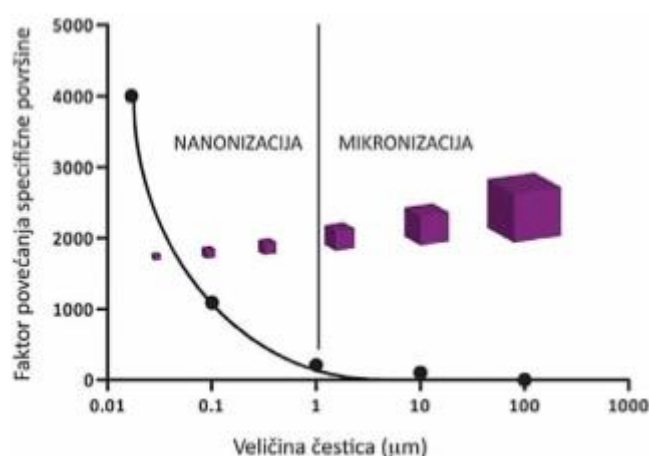
1.1.1. SVOJSTVA I SPECIFIČNOSTI NANOKRISTALA

Nanokristali su čestice koje imaju veličinu od 1 do 1000 nm. Jedan od glavnih razloga primjene nanokristala jest povećanje brzine otapanja povećanjem specifične površine tvari. Smanjenje veličine čestica dovodi do povećanja površine što u konačnici povećava brzinu otapanja kako je izraženo Noyes – Whitneyjevom jednačinom:

$$\frac{dc_x}{dt} = k \times A \times (c_s - c_x)$$

(k – konstanta brzine otapanja, A – specifična površina tvari koja se otapa, c_s – topljivost tvari, c_x – koncentracija tvari u otopini u vremenu t)

Jednačina je izvedena na temelju modela u kojem je dispergirana čestica u otapalu okružena tankim stacionarnim slojem otapala (Jalšenjak i sur., 1998). Iz Noyes-Whitneyjeve jednačine mogu se pretpostaviti razlike u brzini otapanja između mikroniziranih i nanoniziranih čestica djelatne tvari jer je brzina otapanja krutine to veća što je veća površina krutine s koje se odvija proces otapanja. Značajno povećanje specifične površine nanoniziranih čestica djelatne tvari pozitivno utječe na njezina biofarmaceutska svojstva kao što su adhezivnost i vrijeme zadržavanja na mjestu apsorpcije (Lobenberg i Amidon, 2000).



Slika 1.: Specifična površina tvari povećava se sa smanjenjem veličine čestica djelatne tvari od mikrometarskih do nanometarskih veličina (Lovrić i sur., 2015).

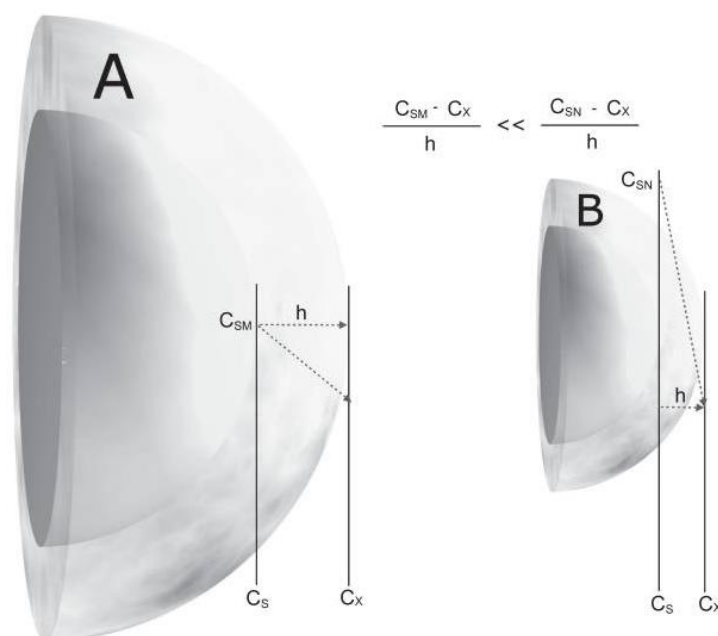
Nadalje, prema Noyes-Whitneyjevoj jednačini brzina otapanja nanočestica dodatno se povećava jer je omjer dc_x/dt proporcionalan gradijentu koncentracije $(c_s - c_x)/h$, a jedno od svojstava nanočestica jest i smanjenje debljine stacionarnog difuznog sloja otapala. (Slika 2.)

U usporedbi s mikrokristalima, dolazi do značajnog povećanja koncentracijskog gradijenta i povećanja brzine otapanja nanočestica (Junghanns, 2006). (D – prividni koeficijent difuzije tvari u otapalu, h – debljina stacionarnog sloja otapala)

$$\frac{dc_x}{dt} = k \times A \times (c_s - c_x) \quad ; \quad k = \frac{D}{h}$$

(D – prividni koeficijent difuzije tvari u otapalu, h – debljina stacionarnog sloja otapala)

$$\frac{dc_x}{dt} = A \times D \times \left(\frac{c_s - c_x}{h} \right)$$



Slika 2.: Usporedba debljine stacionarnog difuzijskog sloja otapala h između čestice A mikrometarske veličine i čestice B nanometarske veličine (Junghanns, 2006).

Nanočestice pokazuju još jedno značajno fizikalno – kemijsko svojstvo, a to je povećanje topljivosti. Krutina se otapa u kontaktu s otapalom sve dok se otopina ne zasiti, tj. dok se ne postigne ravnotežno stanje između koncentracije neotopljene tvari i koncentracije otopljene tvari (Atkins i de Paula, 2014). Svaka tvar ima konstantnu topljivost, a izražava se kao vrijednost pojedine tvari u određenom otapalu i pri stalnoj temperaturi. Svođenjem čestica djelatne tvari na nanometarske veličine moguće je povećati topljivost te tvari. Odnos između topljivosti i veličine čestica krute tvari opisan je Ostwald-Freundlichovom jednačbom i iz nje se vidi da se smanjenjem veličine čestica povećava topljivost krutine (Ely i sur., 2014). Važno svojstvo za opisivanje topljivosti neke tvari jest njezina struktura, odnosno nalazi li se ta tvar u

kristalnom ili amorfnom stanju. Tvari u amorfnom stanju imaju bolju topljivost od tvari u kristaliničnom stanju jer je slobodna energija amorfnog oblika veća od slobodne energije kristaliničnog oblika. Dakle, za postizanje najbolje topljivosti može se koristiti krutina u amorfnom stanju svedena na nanometarske veličine. Ipak, tu je potrebno zadovoljiti zahtjev da tvar u amorfnom obliku bude stabilna tijekom roka trajanja farmaceutskog proizvoda.

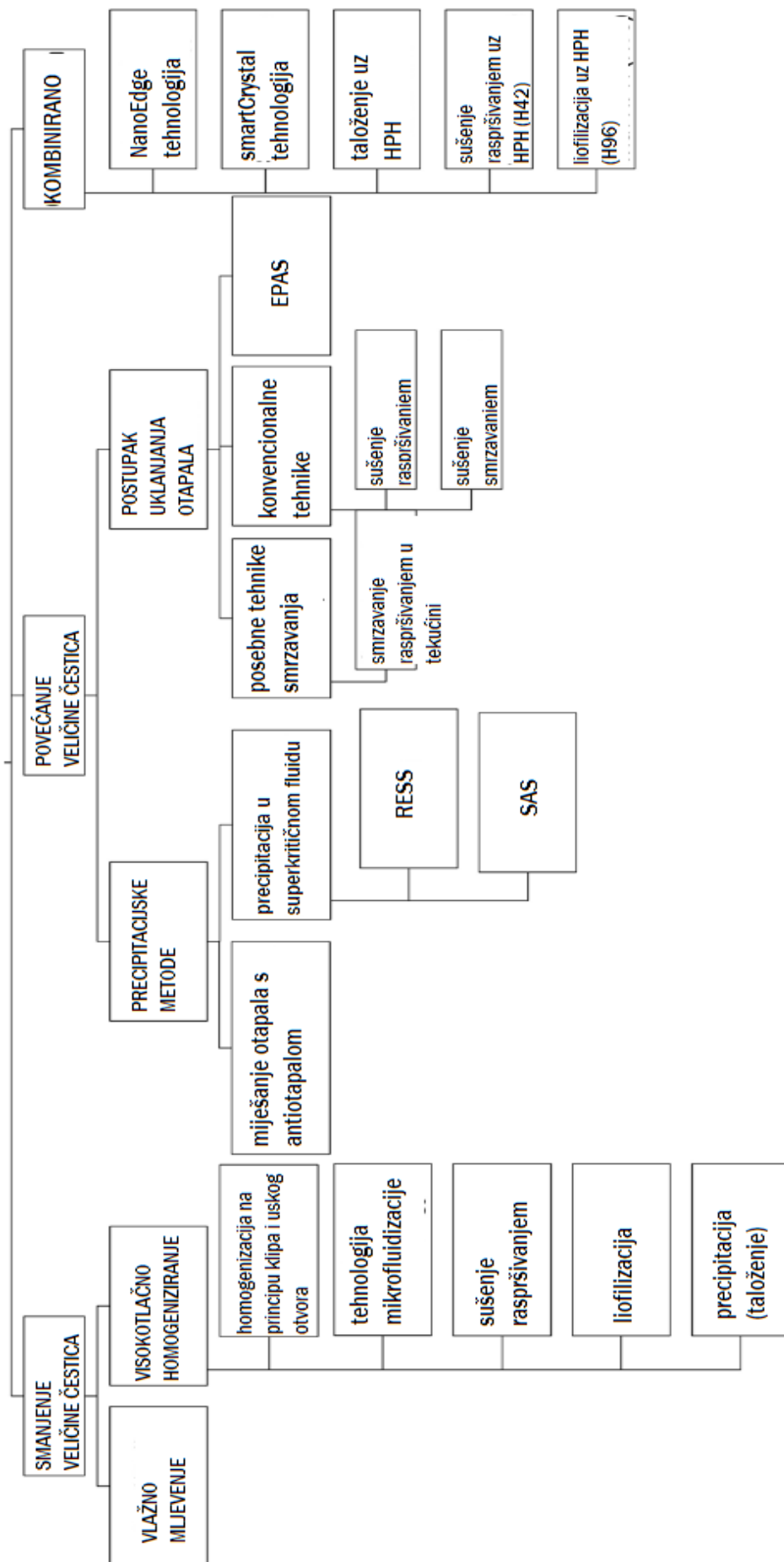
1.1.2. POSTUPCI I METODE PROIZVODNJE NANOKRISTALA

Postoje različite metode i postupci za proizvodnju nanokristala u željenom obliku i veličini. Uglavnom se koriste postupci vlažnog mljevenja, visokotlačne homogenizacije, precipitacije (taloženja) te njihove kombinacije (Junghanns i Müller, 2008). Metode izrade nanokristala mogu se ugrubo podijeliti u dvije skupine: metode smanjenja veličina čestica i metode povećanja veličine čestica. Odabir načina pripreme nanokristala djelatne tvari ovisi o fizikalno-kemijskoj prirodi te tvari. Pregled tehnologija koje se koriste za proizvodnju nanokristala prikazan je na Slici 3.

Metoda povećanja veličine čestica djelatne tvari (engl. *bottom-up methods*) je najstarija tehnika pripreme nanokristala djelatne tvari (Gao i sur., 2008). Djelatna se tvar otopi u odgovarajućem otapalu, a zatim se dodaje antiotapalo koje dovodi do taloženja fino dispergiranih nanokristala. Metoda je relativno jednostavna, ali je potrebno odrediti uvjete taloženja (Lovrić i sur., 2015). Otapala koja se koriste najčešće su organska, a djelatna tvar mora imati relativno dobru topljivost u tom otapalu. Otopina djelatne tvari mora se miješati s antiotapalom, ali se sama djelatna tvar ne smije otapati u antiotapalu. Za proizvodnju nanokristala slabo topljivih tvari kao antiotapalo se obično koristi voda (de Waard i sur., 2011). Uređaji za miješanje koji se koriste za miješanje otopine djelatne tvari i antiotapala zasnivaju se na rotaciji, mlaznom miješanju (engl. *liquid jets*) ili višekanalnom mlaznom miješanju (engl. *multi-inlet vortex mixing*) (Lovrić i sur., 2015). Za taloženje djelatne tvari mogu se koristiti i superkritični fluidi, kao što je superkritični ugljikov dioksid, CO₂. Određivanje uvjeta taloženja je najkompliciraniji dio ove metode, stoga se ona još uvijek ne primjenjuje za industrijsku proizvodnju nanokristala djelatne tvari. Nanokristali dobiveni metodom taloženja mogu biti kristalne ili amorfne prirode (Sun i Yeo, 2012). Za industrijsku uporabu metode taloženja kao problem se javlja prilagodba brzine taloženja djelatne tvari, a miješanje je vrlo usporeno u velikim industrijskim spremnicima što se odražava na veličinu i raspodjelu čestica konačne nanosuspenzije (Muller i sur., 2011).

Slika 3.: Klasifikacijski prikaz tehnologija koje se koriste za proizvodnju nanokristala. Značenje kratica: RESS – brza ekspanzija superkritične otopine, SAS – superkritično antiotapalo, EPAS – isparavajuće taloženje u vodenoj otopini (Sharma i sur., 2016).

TEHNIKE PROIZVODNJE NANOKRISTALA



Druga skupina farmaceutsko – tehnoloških metoda izrade nanokristala su metode smanjenja veličine čestica (engl. *top – down methods*). Veličina čestica krutine djelatne tvari smanjuje se na manje dimenzije korištenjem postupka vlažnog mljevenja (engl. *wet milling*) ili visokotlačnog homogeniziranja (engl. *high pressure homogenization*). Metoda vlažnog mljevenja danas je najviše korištena metoda u industrijskoj proizvodnji nanokristala djelatne tvari.

Može se koristiti postupak niskoenergetskog vlažnog mljevenja, koji je jednostavnija opcija, ili visokoenergetsko vlažno mljevenje koje je industrijski prihvatljivije jer je brže. Mikronizirana djelatna tvar dispergira se u disperzijskom sredstvu uz dodatak stabilizatora. Djelovanjem kuglica i mješača djelatna se tvar melje zbog smičnih naprezanja na velike čestice suspendirane djelatne tvari (Lovrić i sur., 2015). Kod visokoenergetskog vlažnog mljevenja čestice djelatne tvari izložene su utjecaju visoke energije, a smanjivanje čestica rezultat je djelovanja sila smicanja i tlaka unutar komore za mljevenje. Količina disperznog sredstva i djelatne tvari te brzina i vrijeme rotacije predstavljaju značajne procesne parametre (Sharma i sur., 2016). Vrijeme mljevenja ovisi o mnogim čimbenicima, a može trajati od oko 30 minuta do nekoliko sati ili dana (Merisko-Liversidge i sur., 2003). Problem kod visokoenergetskog vlažnog mljevenja je abrazija kuglica od cirkonijevog oksida što rezultira onečišćenjem nanosuspenzije djelatne tvari. To je izrazito važno kod izrade nanokristala djelatne tvari za kroničnu ili oftalmičku primjenu. Zbog toga se, umjesto cirkonijevih, koriste polistirenske kuglice za mljevenje izrazito elastičnih svojstava. Glavna prednost metode vlažnog mljevenja jest prilagodljivost uzorku jer se tim postupkom gotovo svaka djelatna tvar može samljeti do nanometarskih veličina čestica (Moschwitzter, 2013).

Kod proizvodnje nanokristala djelatne tvari metodom visokotlačnog homogeniziranja postoje tri važne tehnologije: mikrofluidizacija (IDD-PTM tehnologija), homogenizacija na principu klipa i uskog otvora u vodenom (Dissocubes[®] tehnologija) ili nevodenom mediju (Nanopure[®] tehnologija) (Lovrić i sur., 2015). Mikrofluidizacijom se mogu stvoriti nanometarske čestice uslijed frontalnog sudara dvaju fluida pod tlakom od 1700 bara što dovodi do sudara čestica djelatne tvari, posmičnih i kavitacijskih sila (Tunick i sur., 2002). Za stabiliziranje željene veličine čestica potreban je dodatak surfaktanta. Za dobivanje nanokristala djelatne tvari treba provesti 50 ili više mikrofluidizacijskih ciklusa (Junghanns i Müller, 2008). Homogenizacija na principu klipa i uskog otvora je slična vlažnom mljevenju i relativno jednostavna. Makrosuspenzija djelatne tvari prolazi kroz nekoliko visokotlačnih homogenizacijskih ciklusa, a primijenjeni tlak iznosi između 1000 i 2000 bara (Moschwitzter, 2013). Mjehuri koji su

stvoreni uslijed vrenja vode implodiraju što uzrokuje smanjenje veličine čestica djelatne tvari zbog kavitacije. Ukoliko se visokotlačno homogenizacija odvija u nevodenom mediju, smanjenje dimenzija čestica posljedica je sila smičnog naprezanja i kolizije čestica. Metoda visokotlačnog homogeniziranja svoju je industrijsku primjenu našla u proizvodnji farmaceutskih ili prehrambenih liposoma i emulzija. Također, tijekom primjene te metode može se održavati aseptičko stanje te je stoga primjenjiva za izradu nanosuspenzija za parenteralnu primjenu (Krause i Müller, 2011).

Kombinirani postupci izrade nanokristala djelatne tvari sastoje se od dva dijela pri čemu se u prvom koraku djelatna tvar predobrađuje taloženjem, a u drugom se koraku visokotlačnom homogenizacijom smanjuje veličina čestica. Nanokristali dobiveni kombiniranim postupcima imaju veličinu ispod 200 nm (Junghanns i Müller, 2008). NANOEDGE®, smartCrystals®, ARTcrystal®, H42 i H99 tehnologija primjeri su kombiniranih postupaka za proizvodnju nanokristala (Shegokar i Müller, 2010). Ipak, kombinirani postupci su složeniji, a samim time i skuplji pa ih valja koristiti samo ako nije moguće primijeniti postupak vlažnog mljevenja ili visokotlačnog homogeniziranja (Liu, 2013).

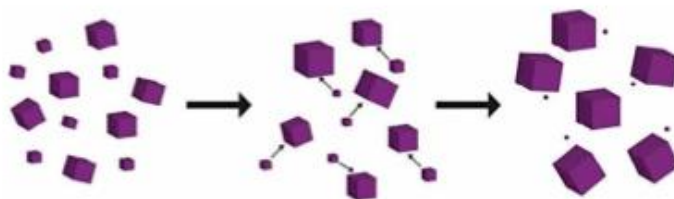
Tablica 1.: Usporedba prednosti, nedostataka i procesnih parametara tehnologija koje se koriste za proizvodnju nanokristala (Sharma i sur., 2016).

Tehnologija	Procesni parametri	Prednosti	Nedostaci
<u>Metode taloženja</u> Hydrosol NanoMorph™	Brzina dodavanja otapala, topljivost lijeka u otapalu, količina stabilizatora, omjer otapala i antiotapala	Mogućnost dobivanja manjih veličina čestica, amorfni karakter produkta, povećanje topljivosti	Zaostala organska otapala, mogućnost rekristalizacije, male mogućnosti za industrijsku uporabu
<u>Metode vlažnog mljevenja</u> Nanomill® Dynomill® Nanocrystals™	Brzina i vrijeme mljevenja, količina sredstva za mljevenje, količina djelatne tvari, temperatura	Primjena u industriji, jednostavan proces, izbjegavanje organskih otapala, primjenjivo za velike količine	Visoka vjerojatnost kontaminacije, dugo vrijeme obrade, velika količina sredstva za mljevenje ograničava veličinu šarže
<u>Visokotlačna homogenizacija</u> Microfluidizer Dissocubes® Nanopure	Homogenizacijski ciklus, tvrdoća materijala	Pogodno za gotovo sve vrste lijekova, obnovljivost metode, manje onečišćenja, visoka djelotvornost	Velika raspodjela veličine čestica, neprikladno za termooosjetljive tvari, dugo vrijeme obrade

<u>Kombinirane metode</u>	Kombinacija procesnih parametara	Potreban manji broj ciklusa i energije za smanjenje veličine čestica, moguće proizvesti čestice manje od 100 nm	Zaostala organska otapala, povećan broj ciklusa obrade, povećan trošak proizvodnje
NANOEDGE™ H42 H96 CT ARTcrystal®	visokotlačnog homogeniziranja i vlažnog mljevenja ili precipitacije		

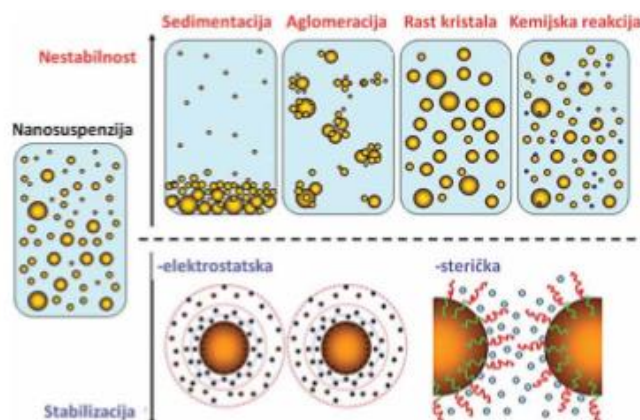
1.1.3. STABILNOST SUSPENZIJA NANOKRISTALA

Smanjivanje dimenzija čestica djelatne tvari na nanometarsku veličinu rezultira povećanjem slobodne Gibbsove energije i specifične površine te tvari. Ta promjena slobodne Gibbsove energije čini sustav termodinamički nestabilnim te je izražena tendencija stvaranja primarnih nanokristala (aglomerata) ili rasta kristala (Wang i sur., 2013). Oswaldov mehanizam zrenja nanosuspenzija jedan je od glavnih uzroka nestabilnosti. (Slika 4.) U nanosuspenziji manji se kristali otapaju brže od većih kristala, stvaraju koncentracijski gradijent te konačno uzrokuju rast većih kristala u nanosuspenziji taložeći se na njihovu površinu (Sun i Yeo, 2012).



Slika 4.: Oswaldov mehanizam zrenja nanosuspenzija. Nanosuspenzija sadrži različite veličine nanokristala djelatne tvari; manji se bolje i brže otapaju te otopljena tvar difundira prema većim neotopljenim nanokristalima, taloži se na njih i povećava njihovu veličinu (Lovrić i sur., 2015).

Drugi problem koji uzrokuju nestabilnost nanosuspenzija jesu aglomeracija, taloženje i razgradnja djelatne tvari. (Slika 5.) Flokulacija nanosuspenzija djelatne tvari rezultat je privlačenja između čestica nanokristala pri čemu nastaju aglomerati nanokristala.



Slika 5.: Prikaz procesa koji utječu na fizičku (aglomeracija, taloženje, rast kristala) i kemijsku (razgradnja tvari) nestabilnost nanosuspenzija djelatne tvari. Stabilnost nanokristala moguće je povećati mehanizmima ionske ili steričke stabilizacije (Lovrić i sur., 2015).

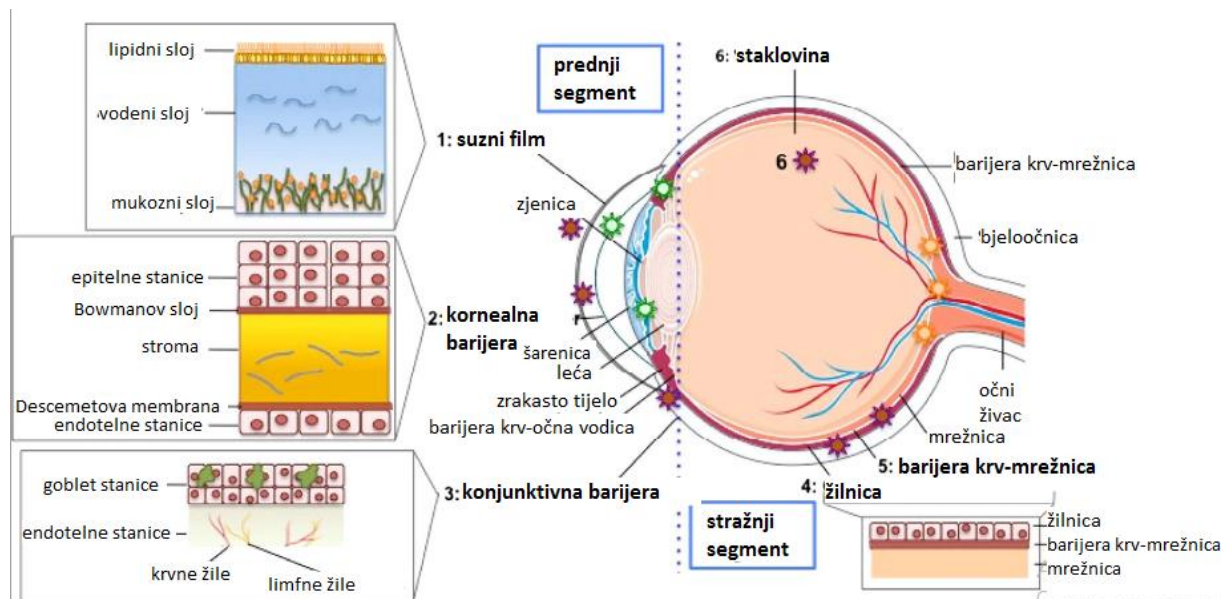
Kako bi se povećala stabilnost nanosuspenzije koriste se oblagajuća sredstva za stabiliziranje ili se izrađuje suhi oblik nanokristala djelatne tvari (Wang i sur., 2013). Stabilizatori se koriste za smanjenje slobodne energije sustava i za osiguranje stabilnosti sustava tijekom dužeg vremenskog perioda. Kao stabilizatori najčešće se koriste površinski aktivne tvari (PAT). Stabilnost izrađene nanosuspenzije djelatne tvari predstavlja glavni problem pri primjeni nanotehnologije u farmaceutskoj industriji (Lovrić i sur., 2015).

1.2. OGRANIČENJA OFTALMIČKE PRIMJENE LIJEKA

Oftalmička primjena lijeka vrlo je zahtjevana zbog fizioloških i anatomske karakteristike oka, poglavito jer postoji nekoliko membrana i barijera koje kontroliraju očnu isporuku lijekova. (Slika 6.) Pošto je oko vrlo osjetljiv organ, ima složeni sustav zaštitnih barijera koje ga štite od prisustva stranih čestica. U sustav zaštite oka od neželjenih čestica pripada spontano treptanje, inducirano suzenje (lakrimacija), suzni film i nepropusni epitel (Camasmie Peters i sur., 2019). Barijere koje otežavaju primjenu topičkih i sistemskih lijekova oftalmičkim putem mogu se podijeliti na fiziološke i anatomske barijere.

Glavna fiziološka barijera koja sprječava lokalnu primjenu lijeka jest prisustvo suznog filma. Suzni se film sastoji od lipidnih komponenti i ostalih makromolekula kao što su globulin, lizozimi i albumin. pH vrijednost suznog filma iznosi 7,4, volumen oko $6,2 \pm 2 \mu\text{L}$, a srednja debljina iznosi $7 \mu\text{m}$ (Zhou i sur., 2012). Sastoji se od tri različita sloja: lipidnog, vodenog i sluznog. Prvi, lipidni, sloj suznog filma u kontaktu je s vanjskim okruženjem, ravnomjerno pokriva vanjski segment oka i štiti ga od suhoće. Drugi, vodeni, sloj čine elektroliti, proteini, peptidi i mali metaboliti i mucini; sprječava isušivanje oka, predstavlja zaštitu od patogena, osigurava podmazivanje tijekom treptanja i pokreta očiju (Camasmie Peters i sur., 2019). Treći sloj suznog filma sastoji se uglavnom od negativno nabijenih mucina (ostatci sijalinske kiseline i sulfati) i najbliži je površini rožnice. S obzirom na prisustvo negativnog naboja može se povećati vrijeme zadržavanja i bioraspoloživost djelatne tvari ukoliko je ona pozitivno nabijena. Na temelju elektrostatičkih interakcija između suprotnih naboja razvijene su kationske nanočestice djelatne tvari (Lam i sur., 2014). Suzni se film obnavlja nakon svakog treptaja oka. Tom prilikom dolazi do priljeva novog suznog filma iz suznih (lakrimalnih) žlijezda i brzog

ispiranja lijeka u nazolakrimalni kanal. To dovodi do slabe bioraspoloživosti primijenjenog lijeka, a ujedno i do neželjenih sistemskih nuspojava (Bron i sur., 2004).



Slika 6.: Prikaz očnih barijera (crvene zvjezdice) koje ograničavaju primjenu lijeka oftalmičkim putem. Zelenim su zvjezdicama označene farmakološke mete prednjeg segmenta oka, a žutim zvjezdicama mete stražnjeg segmenta oka (Sharma i sur., 2016).

Druga skupina barijera vezana je uz anatomsku građu oka. Način isporuke lijeka može ići kornealnim, konjunktivnim ili skleralnim putem, ovisno o fizikalno – kemijskim svojstvima molekule lijeka (Ye i sur., 2013). Kornealni put primjene lijeka je najčešći, a primjenjuje se pri liječenju infekcija prednjeg segmenta oka. Stoga su epiteli rožnice presudni dijelovi kornealne barijere koja ograničava apsorpciju lijekova. Te stanice višeslojnog epitela rožnice međusobno su povezane tijesnim spojevima (engl. *tight junctions*) što uvelike ograničava prolaz hidrofilnih molekula. No, hidrofilne djelatne tvari mogu lakše prodrijeti kroz kornealnu barijeru na mjestima gdje su stanice epitela povezane dezmosomima, drugim načinom međustaničnog povezivanja (Grass i Robinson, 1988). Nadalje, stroma rožnice sastoji se prvenstveno od kolagena koje je hidrofilan što djeluje ograničavajuće na jako lipofilne djelatne tvari (Weng i sur., 2017). Glavni čimbenici o kojima ovisi prolazak lijeka kroz rožnicu su njegova lipofilnost, naboj, stupanj ionizacije te pH formulacije.

Nakon što lijek nadvlada kornealnu barijeru, susreće se s novim barijerama, najprije očnom spojnicom (konjunktivom), a potom bjeloočnicom. Očna je spojnica bogato opskrbljena krvnim žilama, a vrčaste stanice na površinskom sloju epitela stabiliziraju suzni film proizvodnjom sluzi. (Holland i sur., 2013) Zbog značajne prokrvljenosti, spojnica je zaslužna za uklanjanje

lijekova sistemskom cirkulacijom. Jednom kada prijeđe konjunktivalnu barijeru, lijek prodire u bjeloočnicu (sclera). Bjeloočnica je propusnija za makromolekule u usporedbi s rožnicom i manje propusna u odnosu na očnu spojnicu (K-i i sur., 2005).

Krvno – okularne barijere u koje se ubrajaju barijera krv – očna vodica i barijera krv – mrežnica, ograničavaju ulazak lijeka iz sistemske cirkulacije u intraokularno područja. Barijera krv – očna vodica sastoji se od nepigmentiranog epitela u zrakastom tijelu, a tijesni spojevi kontroliraju aktivni i paracelularni transport te ograničavaju ulazak hidrofilnog lijeka sustavnom cirkulacijom u prednji segment oka (Weng i sur., 2017). Barijera krv – mrežnica ograničava prijelaz lijeka iz sistemske cirkulacije u mrežnicu, a njena je važnost u tome što sprječava ulazak toksičnih makromolekula u oko. Krvno – mrežnička barijera održava homeostazu unutar mrežnice (Cunha-Vaz. 1976).

Zbog navedenih ograničenja terapijski učinak je nezadovoljavajući ako se lijek primjenjuje sistemski. Da bi se postigla zadovoljavajuća učinkovitost, trebalo bi povećati koncentraciju djelatne tvari što bi rezultiralo sistemskim nuspojavama. Ipak, krvno – okularne barijere djeluju i kao zaštita jer sprječavaju ulazak ksenobiotika i ostalih štetnih tvari iz sistemske cirkulacije. Zbog svih spomenutih barijera i mehanizama uklanjanja lijeka, tek 5% doze topikalno primijenjenog lijeka apsorbira se u oko i prijeđe iz prednjeg u stražnji segment oka (Sanchez-Lopez i sur., 2017). Snažna potreba za modificiranjem načina formulacije i primjene oftalmičkih pripravaka stavila je fokus na nanotehnologiju kao multidisciplinarni pristup ciljnim lijekovima (Franguiero i sur., 2016).

1.3. PRIMJENA NANOKRISTALA U OFTALMIČKIM PRIPRAVCIMA

1.3.1. SVOJSTVA OFTALMIČKIH PRIPRAVAKA TEMLJENIH NA NANOTEHNOLOGIJI

Zbog ranije navedenih anatomskih i fizioloških karakteristika oka, oftalmička primjena lijeka vrlo je izazovna zbog slabe bioraspoloživosti tako primijenjenog lijeka. Kapi za oko, koje se uglavnom koriste za liječenje infekcija i drugih oboljenja prednjeg segmenta oka, imaju lošu bioraspoloživost zbog brzog ispiranja djelatne tvari s površine oka i relativne nepermeabilnosti rožnice (Lovrić i sur., 2015). Masti za oftalmičku primjenu imaju donekle bolju bioraspoloživost, ali se javlja problem zamagljenosti vida nakon primjene. Istraživanja su pokazala da se primjenom nanotehnologije mogu nadvladati problemi u isporuci oftalmičkih lijekova i postići zadani ciljevi, npr. dovoljna koncentracija djelatne tvari koja u željenom dijelu oka ima povoljan terapijski učinak (Sharma i sur., 2016).

Primjena nanotehnologije u oftalmologiji započela je 1980. kada su upotrijebljeni nosači u obliku liposoma. Zbog malih dimenzija, nanonosači su pokazali malu iritaciju uz poboljšanu komatibilnost unutar očnog tkiva. Nanonosači pomažu prolazu djelatne tvari kroz fiziološke barijere i upravo su zbog toga istraživani za oftalmičku primjenu jer su onemogućavali barijerno smanjenje željene koncentracije djelatne tvari na ciljnom mjestu. (Reimondez-Troitino i sur., 2015).

Istraživajući svojstva i karakteristike nanokristala, uvidjele su se prednosti njihove primjene u oftalmičkoj primjeni lijekova. Nanokristali su čestice djelatne tvari bez prisustva matriksa, dok površinu kristala prekriva stabilizirajuća tvar koja posreduje steričku stabilnost te sprječava Ostwaldovo zrenje (Tuomela i sur., 2014). Nanokristali djelatne tvari primjenjeni u obliku nanosuspenzije pokazuju smanjenu iritaciju površine oka, suženje i uklanjanje iz prekornealnog područja (Lovrić i sur., 2015). Glavne prednosti dosad istraženih nanokristala za oftalmičku primjenu su povećana sigurnost oka, dulje zadržavanje formulacije lijeka u prednjem segmentu oka, povećana permeabilnost kroz rožnicu, poboljšana bioraspoloživost i podnošljivost (Sharma i sur., 2016). (Tablica 2.)

Tablica 2.: Djelatne tvari koje se u obliku nanokristala koriste za liječenje oftalmoloških bolesti (Camasmie Peters i sur., 2019).

Djelatna tvar	Indikacija	Metoda izrade	Stabilizator	Veličina čestica (nm)
Hidrokortizon (0,1% m/V)	Upala oka	Mikrofluidna precipitacija	Kollidon [®] 30 (0,2% m/V), HPMC (0,5% m/V) i Tween [®] 80 (0,1% m/V)	295 ±32
Hidrokortizon (0,1% m/V)	Upala oka	Vlažno mljevenje	Kollidon [®] 30 (0,2% m/V), HPMC (0,5% m/V) i Tween [®] 80 (0,2% m/V)	~300
Hidrokortizon (0,1% m/V)	Upala oka	Visokotlačna homogenizacija	Pluronic F68 (0,1% m/V)	539
Prednizolon (0,1% m/V)	Upala oka	Visokotlačna homogenizacija	Pluronic F68 (0,1% m/V)	211
Deksametazon (0,1% m/V)	Upala oka	Visokotlačna homogenizacija	Pluronic F68 (0,1% m/V)	930
Deksametazon acetat (0,05% m/m) i polimiksin B sulfat (0,1% m/m)	Upala oka	Vlažno mljevenje	Cetilpiridin klorid (0,01% m/m) ili benzalkonij klorid (0,01% m/m)	~250

Deksametazon	Upala oka	Sušenje raspršivanjem	Nije primjenjivo	833
Fluorometolon	Upala oka	Sušenje raspršivanjem	Nije primjenjivo	620
Tranilast (0,5% m/V)	Upala oka	Vlažno mljevenje	HPBCD (5% m/V)	34 ±20
Indometacin (0,5% m/V)	Upala oka	Vlažno mljevenje	HPBCD (5% m/V)	76±59
Nilvadipin (1% m/V)	Retinopatija	Vlažno mljevenje	HPBCD (0,5% m/V)	77
Brinzolamid (5% m/m)	Glaukom	Vlažno mljevenje	HPMC (1,25% m/m)	530 ±2
Forskolin (10% m/V)	Glaukom	Vlažno mljevenje	Poloxamer 407 (3% m/m)	45 – 400

Klasične kapi za oko zahtijevaju velike količine površinski aktivnih tvari što dovodi do iritacije oka u obliku povećanja crvenila i suhoće oka. Oftalmičke nanosuspenzije pokazale su manje iritirajući učinak na oko od komercijalno dostupnih formulacija ciklosporina A te transilasta, disulfirama i kalpaina (Kim i sur., 2011, Nagai i sur., 2015). Kao što je već rečeno, značajnu ulogu u uklanjanju oftalmički primijenjenog lijeka ima suzni film. Nanokristali djelatne tvari prodiru kroz sluzni sloj suznog filma i dolaze u kontakt s rožnicom gdje se zadržavaju i ispoljavaju terapijski učinak (primjer nanokristala loteprednol etabonata) (Popov i sur., 2013). Dodatno zadržavanje formulacije može se postići pripremom *in situ* gela suspenzije ili povećanjem viskoznosti.

Za liječenje glaukoma ili oboljenja mrežnice potreban je prolazak lijeka kroz rožnicu. Primjenom nanokristala također je povećana permeabilnost rožnice i topljivost slabo topljivih djelatnih tvari. Povećana propusnost lijeka može biti posljedica inhibicije P – glikoproteina u epitelnim stanicama neionskim površinski aktivnim tvarima kao i endocitoze nanokristala djelatne tvari (Reimondez-Troitino i sur., 2015). Nadalje, nanokristali pokazuju trenutačno i produženo oslobađanje djelatne tvari nakon topikalne oftalmičke primjene. Velika specifična površina nanokristala djelatne tvari rezultira povećanom topljivošću i postizanjem veće početne koncentracije lijeka koja ima terapijski učinak. U interakciji s biološkim membranama nanokristali stječu mukoadhezivna svojstva i povećavaju vrijeme zadržavanja u oku što rezultira produženim oslobađanjem djelatne tvari i posljedično dužim terapijskim učinkom (Ravichandran, 2009).

Tablica 3.: Pripravci temeljeni na nanotehnologiji za liječenje oftalmičkih bolesti odobreni od strane FDA (*Food and Drug Administration*, SAD) i EMA (*European Medicine Agency*, EU) ili u kliničkim ispitivanjima (Camasmie Peters i sur., 2019).

Proizvod	Djelatna tvar	Indikacija	Metoda izrade	Vrsta priprema	Veličina čestica (nm)	Godina odobrenja ili klinička faza
Restasis® (Allergan)	Ciklosporin A 0,05% (m/m)	Sindrom suhog oka	Miješanje smicanjem i visokotlačna homogenizacija	Nanoemulzija	279	2002. (FDA)
Ilevro® (Novartis Pharms Corp)	Nepafenak 0,3% (m/m)	Upala i bol nakon operacije katarakte	Vlažno mljevenje	Nanokristali	Otprilike 605	2012. (FDA), 2013. (EMA)
Retaine® MGD™ (Ocusoft, SAD) ili Cationorm (Santen, EU)	Niti jedna	Sindrom suhog oka	Visokotlačna homogenizacija	Kationska nanoemulzija	150 – 300	2008. (Francuska)
Ikervis® (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)	Ciklosporin 0,1% (m/m)	Teški keratitis u pacijenata s bolešću suhog oka	Miješanje smicanjem i visokotlačna homogenizacija	Kationska nanoemulzija	100 - 250	2015. (EMA)
Vekacia® (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)	Ciklosporin 0,1% (m/m)	Teški vernalni keratokonjunktivitis	Visokotlačna homogenizacija	Kationska nanoemulzija	150 – 300	2018. (EMA)
Cyclocat® (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)	Ciklosporin 0,1% (m/m)	Teški keratitis u pacijenata s bolešću suhog oka	Visokotlačna homogenizacija	Kationska nanoemulzija	150 – 300	Faza II (SAD)
Catioprost® (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)	Latanoprost 0,005% (m/m)	Glaukom, očna hipertenzija	Visokotlačna homogenizacija	Kationska nanoemulzija	150 - 300	Faza II (EU)

1.3.2. PRIMJERI NANOPRIPRAVAKA ZA OFTALMIČKU PRIMJENU

Nanokristali za oftalmičku uporabu mogu se proizvesti već ranije spomenutim dvjema metodama: „odozdo prema gore“ (precipitacijske metode) i „odozdo prema dolje“ (vlažno mljevenje, visokotlačna homogenizacija). Također, može se koristiti i kombinacija tih dviju metoda. Provedena je usporedna studija na primjeru nanosuspenzije hidrokortizona za oftalmičku primjenu te su uspoređene metode vlažnog mljevenja i mikrofluidne nanoprecipitacije. Obje nanosuspenzije postigle su dvostruko duže djelovanje lijeka u usporedbi s otopinom pripremljenom otapanjem hidrokortizona u propilenglikolu (Ali i sur., 2011). Nadalje, tri gotovo u vodi netopljiva glukokortikoida, hidrokortizon, prednizolon i deksametazon, pokazali su dvostruko i trostruko produženje boravka lijeka na željenom mjestu ako se umjesto otopine pripravi nanosuspenzija navedenih glukokortikoida. (Kassem i sur., 2007).

Nanosuspenzije za oftalmičku primjenu u nekim slučajevima mogu smanjiti neželjene učinke lijeka ili njegovu toksičnost. S tim ciljem pripremljena je i nanosuspenzija indometacina. *In vivo* i *in vitro* studije pokazale su bolji prolazak kroz rožnicu tako pripremljenog lijeka u odnosu na komercijalno dostupan proizvod. Površina ispod krivulje (AUC) za nanosuspenziju indometacina iznosila je $819,5 \pm 91,3 \mu\text{M}/\text{min}$, odnosno $76,5 \pm 16,9 \mu\text{M}/\text{min}$. Nadalje, navedena je nanosuspenzija pokazala bolju podnošljivost u staničnoj liniji epitela rožnice (HCE-T) u usporedbi s drugim nesteroidnim protuupalnim lijekovima koji se koriste u u komercijalnoj primjeni (Nagai i sur., 2014).

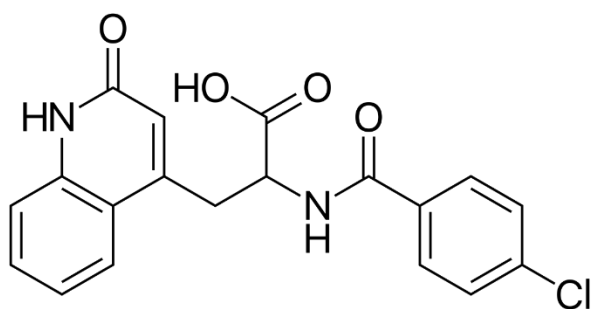
U nastojanju da se pronađe način lokalnog liječenja stražnjeg segmenta oka, pripremljene su suspenzije nilvadipina za liječenje disfunkcije mrežnice. Primjena te nanosuspenzije smanjila je disfunkciju mrežnice te nije primijećen periferni edem mrežnice koji je znana nuspojava nilvadipina. Kao površinski aktivna tvar za sprječavanje agregacije čvrstih nanočestica korišten je 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin (HP β CD) koji je zamijenio neionske stabilizatore koji se obično primjenjuju u tim formulacijama (Deguchi i sur., 2017).

Iako nanotehnologija postaje sve prisutnija u biomedicini i zdravstvu, pa tako i u formuliranju pripravaka za oftalmološku primjenu, još uvijek ne postoji značajan broj znanstvenih studija koje se bave primjenom nanokristala u oftalmološkim pripravcima. Stoga postoji nezanemariv potencijal u istraživanjima slabo topljivih lijekova koji se primjenom nanotehnologije mogu uobličiti u primjenjive i djelotvorne formulacije.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Za liječenje problema suhog oka u azijskim se zemljama koristi djelatna tvar rebamipid. Na tržištu postoji rebamipid u obliku 2% suspenzije za oftalmičku uporabu. Čestice rebamipida su mikrometarskih veličina, a mliječno-bijela suspenzija nakon primjene uzrokuje kratkotrajno zamućenje vida.

Rebamipid ($C_{19}H_{15}ClN_2O_4$; 2-[(4-klorobenzoil)amino]-3-(2-okso-1*H*-kinolin-4-il)propanoična kiselina) je aminokiselinski analog 2(1*H*)-kinolinona. Razvijen je od strane Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokijo, Japan), a u kliničku uporabu uveden je 1980. godine za liječenje peptičkog čira i lezija povezanih s gastritisom (Matsuda i sur.,2016). Mehanizam djelovanja rebamipida uključuje indukciju sinteze ciklooksigenaze 2 (COX2) što rezultira povećanjem endogene sinteze prostaglandina u želučanoj sluznici. Također, sudjeluje u eradikaciji *H. pylori* proizvodnjom tumor nekrotirajućeg faktora α (TNF- α) i potiče ekspresiju gena za receptore prostaglandina EP4 što posljedično uzrokuje sekreciju mucina i dodatnu obranu želučane sluznice. (Kashima i sur., 2014).



Slika 7.: Strukturna formula rebamipida.

Povećanje količine želučanih mucina djelovanjem rebamipida, rezultiralo je istraživanjem njegovog učinka na mucine prisutne na površini oka. U nekliničkim studijama potvrđeno je da rebamipid povećava količinu mucina sličnih glikoproteinima na rožnici i spojnici oka (Takeji i sur., 2013). U kliničkim ispitivanjima pokazalo se da oftalmičke suspenzije rebamipida mogu učinkovito djelovati na suho oko i oštećenja epitela rožnice te mogu obnoviti mikrostrukturu oka odgovornu za održavanje stabilnosti suznog filma (Kashima i sur., 2014). Na temelju tih saznanja u Japanu je 2012. godine uvedena 2% oftalmička suspenzija rebamipida za liječenje problema suhog oka.

Navedena 2% suspenzija rebamipida formulirana je pri pH 5,5-6,5 kao bijela mliječna vodena suspenzija koja sadrži čestice rebamipida srednje veličine približno 1 μ m (Otsuka Pharm. Co.,

2015). S obzirom da rebamipid u svojoj strukturi sadrži karboksilne i amidne skupine, njegova topljivost ovisi o pH vrijednosti medija. Iako je 2% suspenzija rebamipida pokazala pozitivni terapijski učinak, prisutni su i određeni nedostaci vezani uz primjenu i proizvodnju takve suspenzije. Zbog veličine čestica rebamipida od približno 1 μm , suspenziju nije moguće sterilizirati korištenjem filtra s porama 0,2 μm što uzrokuje probleme s proizvodnog stajališta (Matsuda i sur., 2016). Nakon primjene mliječno-bijele suspenzije u oko, prisutno je замуćenje vida što bolesnika kratkotrajno sprječava u obavljanju određenih aktivnosti. Takvi su nedostaci postojećeg farmaceutskog oblika rebamipida rezultirali razvojem novih suspanzijskih oblika rebamipida kojima bi se uklonili ili sveli na najmanju moguću mjeru navedeni nedostaci.

Cilj ovog rada je dobiti stabilnu nanosuspenziju rebamipida uz dodatak površinski aktivnih tvari. Metodom vlažnog mljevenja i mijenjanjem vrste i udjela površinski aktivne tvari cilj je izraditi čestice rebamipida najmanje moguće dimenzije u nanometarskom području uz zadovoljavajući indeks polidisperznosti. Stoga je ispitana veličina čestica prije i nakon mljevenja te utjecaj količine i udjela površinski aktivne tvari na veličinu čestica. Ispitana je najmanja veličina koja se može izraditi te su izmjereni indeksi polidisperznosti. Također, provedena je termalna analiza nanočestica rebamipida u čvrstom stanju diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

Prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada upotrijebljene su sljedeće tvari:

- rebamipid, mikronizirani (Carbosynth Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Polisorbat 80 (polioksietilen sorbitan monooleat) (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- Pluronic F-68 (poloksamer 188) (Kemig, Zagreb, Hrvatska)
- pročišćena voda

3.2. METODE

3.2.1. IZRADA SUSPENZIJA REBAMIPIDA

Kao površinski aktivne tvari (PAT) korištene su Pluronic F-68 i Polisorbat 80 koje su krutine, a s obzirom da ih je bilo potrebno dodati u izrazito malim količinama, pripravljene su 5% otopine navedenih PAT. Po 2,5 g Pluronic F-68 i Polisorbat 80 izvagano je na analitičkoj vagi (Mettler-Toledo, Španjolska) i kvantitativno preneseno u odmjerne tikvice od 50 mL koje su napunjene pročišćenom vodom do oznake. Potom je mikronizirani rebamipid odvagano u količini od 0,1 g te rastrljivano s određenom količinom 5% otopine Pluronic F-68, odnosno Polisorbat 80. Nakon rastrljivanja, uzorci su nadopunjeni pročišćenom vodom (koja je filtrirana preko filtera Chromafil® Xtra PET-45/25) kako bi se postigle željene koncentracije rebamipida (2%) i površinski aktivnih tvari (od 0,125% do 1%) kako je prikazano u Tablici 4. Uzorci su pripremljeni u duplikatu te je jedan uzorak korišten kao kontrolni uzorak (nije mljeven), a drugi je bio podvrgnut postupku mljevenja.

3.2.2. PRIPREMA ZA MLJEVENJE I MLJEVENJE UZORAKA

Korištene su ampule visine 35 mm i promjera 12 mm u koje su prvo dodane kuglice itrij stabiliziranog cirkonijevog oksida različitih veličina. Ukupno je u svaku ampulu dodano 1,5 g kuglica kako slijedi: 0,5 g kuglica promjera 0,1 mm, 0,5 g kuglica promjera 0,2 mm te 0,5 g kuglica promjera 0,4-0,6 mm. Ranije pripremljena suspenzija rebamipida resuspendira se i kapaljkom prenese 2,5 g suspenzije u ampulu s kuglicama. Potom se u svaku ampulu dodaje 5 cilindričnih magnetskih mješača duljine 10 mm i promjera 6 mm te se ampule zatvore parafilmom. Pripremljene ampule stave se na magnetni višekanalni mješač (Magnetic stirrer MIX 15eco, Berlin, Njemačka) i suspenzija miješaja pri sobnoj temperaturi 24 sata pri 350

okretaja po minuti. Nakon isteka 24 sata uzorci su skinuti s mješača i podvrgnuti daljnjim ispitivanjima

Tablica 4: Prikaz uzoraka korištenih u eksperimentalnom dijelu diplomskog rada s navedenom vrstom i količinom PAT te udjelima rebamipida i PAT u uzorku.

Šifra uzorka	m _{rebamipid} (g)	udio rebamipida u uzorku (%)	naziv dodane površinski aktivne tvari	količina dodane PAT (5% ot. PAT) (g)	udio PAT u uzorku (%)	m _{pročišćena voda} (g)
1.A (K)	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,125	0,125	4,775
1.A	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,125	0,125	4,775
1.B (K)	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,125	0,125	4,775
1.B	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,125	0,125	4,775
2.A (K)	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,25	0,25	4,65
2.A	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,25	0,25	4,65
2.B (K)	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,25	0,25	4,65
2.B	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,25	0,25	4,65
3.A (K)	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,5	0,5	4,4
3.A	0,1	2,0	Polisorbat 80	0,5	0,5	4,4
3.B (K)	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,5	0,5	4,4
3.B	0,1	2,0	Pluronic F-68	0,5	0,5	4,4
4.A (K)	0,1	2,0	Polisorbat 80	1,0	1,0	3,9
4.A	0,1	2,0	Polisorbat 80	1,0	1,0	3,9
4.B (K)	0,1	2,0	Pluronic F-68	1,0	1,0	3,9
4.B	0,1	2,0	Pluronic F-68	1,0	1,0	3,9

3.2.3. ODREĐIVANJE SREDNJEG PROMJERA ČESTICA REBAMIPIDA

Srednji promjer određivan je uzorcima rebamipida koji nisu bili mljeveni (kontrolni uzorci) i uzorcima koji su mljeveni 24 sata. Suspenzije su resuspendirane kapaljkom te je automatskom pipetom 400 μ L suspenzije prelijeto u ampulu i razrijeđeno pročišćenom vodom (filtrirana kroz Chromafil® Xtra PET-45/25) do ukupnog volumena od 2,0 mL kako bi se dobilo razrjeđenje od 50 puta. Tako pripremljenim uzorcima mjereno je srednji promjer česticama na uređaju Litesizer 500 (Anton Paar, Austrija). Litesizer 500 određuje svojstva nano i mikro čestica u disperzijama i otopinama mjerenjem dinamičkog raspršenja svjetlosti, elektroforetskog raspršenja svjetlosti i statičkog raspršenja svjetlosti. Oko 1 mL uzorka stavljeno je u kivetu izrađenu od polistirena širine i dužine 10 mm te visine 45 mm. Sva su mjerenja provedena pri temperaturi od 25°C. Iz funkcije intenziteta raspršene svjetlosti ovisno o vremenu dobiva se podatak o veličini i stupnju disperznosti čestica.

3.2.4. TERMALNA ANALIZA NANOČESTICA REBAMIPIDA U ČVRSTOM STANJU DIFERENCIJALNOM PRETRAŽNOM KALORIMETRIJOM

Nakon što su uzorci bili podvrgnuti vlažnom mljevenju, dio suspenzija rebamipida i Polisorbat 80, odnosno Pluronic F-68, pomoću liofilizatora je liofiliziran (sušenje u smrznutom stanju) kako bi se dobile nanočestice rebamipida u čvrstom stanju. Ispitivanje je provedeno korištenjem uređaja Perkin – Elmer DSC 7 (Perkin – Elmer, SAD). Diferencijalno pretražnim kalorimetrom (DSC) mjere se entalpije povezane s prijelazima i kemijskim reakcijama i određuje se temperatura na kojoj se ti procesi odvijaju. Mjerenja su provedena u atmosferi dušika nakon kalibracije uređaja indijem (čistoća 99,98%, talište 156,61°C i $\Delta H_{\text{fus}} = 28,71$ J/g). Uzorci (2-5 mg) su izvagani na analitičkoj vagi (Mettler – Toledo, Španjolska) u aluminijske posudice koje su zatvorene probušnim poklopcem kako bi otapalo moglo slobodno isparavati. Brzina zagrijavanja iznosila je 10°C/min u temperaturnom rasponu od 30 do 350 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. VELIČINA ČESTICA REBAMIPIDA I INDEKS POLIDISPERZNOSTI

Pripravljene suspenzije rebamipida koje nisu bile podvrgnute mljevenju i služile su kao kontrolni uzorci pripremljene su za mjerenje postupkom fotonske korelacijske spektroskopije. Izmjerene su veličine čestica djelatne tvari prije mljevenja kako bi se mogao procijeniti stupanj usitnjenja nakon mljevenja. Također, izmjeren je i indeks polidisperznosti kako bi se utvrdio rasap (disperzija) veličina čestica rebamipida.

Tablica 5.: Veličina i indeks polidisperznosti čestica rebamipida prije mljevenja.

Šifra uzorka	Prosječna veličina čestica (nm)	Srednja vrijednost (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	Srednja vrijednost PDI
1.A (K)	3000	2720	0,4404	0,4177
	2439		0,3949	
1.B (K)	3196	2724	0,8899	0,6245
	2253		0,3590	
2.A (K)	1431	1295	0,6590	0,5750
	1158		0,4909	
2.B (K)	1513	1598	0,5049	0,4606
	1683		0,4163	
3.A (K)	1381	1272	0,6512	0,5295
	1162		0,4077	
3.B (K)	1017	1225	0,6081	0,6423
	1432		0,6765	
4.A (K)	876,6	819,4	0,5103	0,4811
	762,2		0,4519	
4.B (K)	1451	1604	0,4656	0,5352
	1756		0,6047	

Iz dobivenih se rezultata uočava da su sve čestice rebamipida prije mljevenja bile u mikrometarskom rasponu veličina, dok je jedino u uzorku 4.A (K) (1% Pluronic F-68) izmjerena veličina čestica rebamipida manja od jednog mikrometra (819,4 nm). Najveća srednja

vrijednost čestica zabilježena je u uzorcima koji su imali najmanji postotak površinski aktivnih tvari (0,25% Polisorbat 80; 0,25% Pluronic F-68). Indeks polidisperznosti čestica rebamipida prije mljevenja bio je u rasponu između 0,4177 i 0,6423.

Potom je postupkom vlažnog mljevenja provedeno usitnjavanje čestica rebamipida. U tom su postupku korištene kuglice za mljevenje mase 0,5 g u svim veličinama (0,1 mm, 0,2 mm, 0,4-0,6 mm), ukupno 1,5 g kuglica za mljevenje. Veličina čestica nakon mljevenja povezana je s veličinom kuglica za mljevenje, tj. što su kuglice manje bit će manja i dobivena veličina čestica. Manje kuglice se brže pokreću i posljedično je njihova sposobnost erozije površine i razbijanja kristalnih struktura jača. Postoji pravilo da je konačna veličina čestica nakon mljevenja tisuću puta manja od kuglica koje su korištene u procesu mljevenja, npr. kuglice za mljevenje veličine 0,2 mm mogu samljati čestice na veličinu od oko 200 nm (Romero i sur., 2016).

Ipak, ne mogu se odabrati samo kuglice najmanje veličine iz dva razloga. Prvi je vezan uz opremu za vlažno mljevenje jer povećavaju rizik od oštećenja mehaničkih dijelova. Drugo, zbog vrlo brzog smanjenja veličine čestica dolazi do nakupljanja viška energije koja se pretvara u kinetičku energiju te se čestice brže kreću i jače sudaraju što povećava rizik od agregacije (nakupljanja) čestica (Romero i sur., 2016).

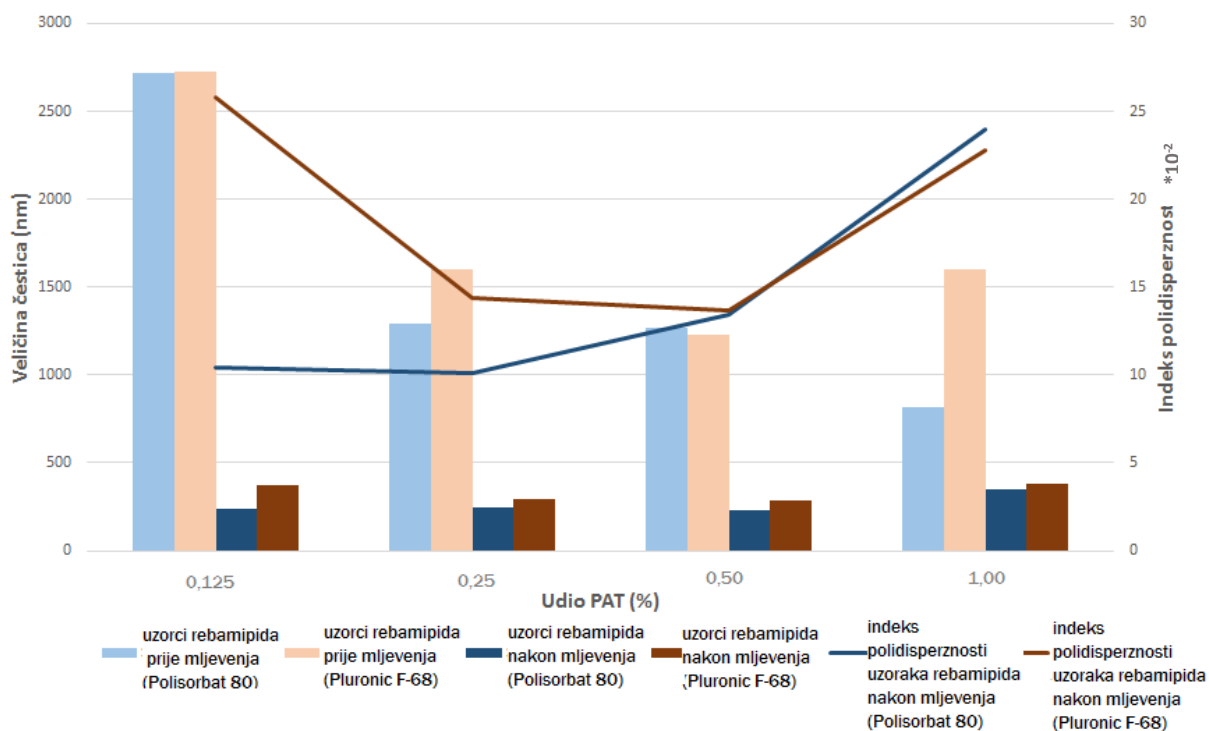
Proces vlažnog mljevenja trajao je 24 sata kako bi se većina čestica uspješno usitnila, odnosno raspodjela njihovih veličina bila što manja. Trajanje procesa od 24 sata je zadovoljavajuće jer povećanjem vremena mljevenja čestice rebamipida se smanjuju, međutim kada vrijeme mljevenja premaši 30 min, prosječna veličina čestica se neznatno promijeni (Guo i sur., 2015). U istraživanju koje je proveo Guo sa suradnicima čestice rebamipida su se nakon 5 minuta vlažnog mljevenja smanjile s mikrometarskih veličina na 600 nm te nastavile smanjivati veličinu sve do 30. minute mljevenja kada su zadržale konačnu veličinu od oko 300 nm.

Nakon usitnjavanja provedeno je mjerenje veličine čestica i indeksa polidisperznosti fotonskom korelacijskom spektroskopijom. Dobiveni rezultati prikazani su za svaki pojedini uzorak u Tablici 6.

Tablica 6.: Veličina i indeks polidisperznosti čestica rebamipida nakon vlažnog mljevenja.

Šifra uzorka	Prosječna veličina čestica (nm)	Srednja vrijednost (nm)	Indeks polidisperznosti (PDI)	Srednja vrijednost PDI
1.A	236,4	241,2	0,0611	0,1093
	245,9		0,1575	
1.B	379,9	374,1	0,2566	0,2583
	368,2		0,2600	
2.A	242,0	242,7	0,0739	0,1014
	243,3		0,1288	
2.B	297,0	295,6	0,1238	0,1441
	294,2		0,1644	
3.A	232,6	232,6	0,1327	0,1346
	232,6		0,1365	
3.B	283,4	282,8	0,1461	0,1366
	282,2		0,1270	
4.A	346,1	348,4	0,2301	0,2394
	350,7		0,2486	
4.B	376,3	378,2	0,2190	0,2277
	380,1		0,2363	

Nakon postupka vlažnog mljevenja sve čestice rebamipida bile su nanometarskog reda veličine. Najbolji rezultat, odnosno najmanja veličina čestica postignuta je u uzorku 3.A (0,5% Polisorbat 80) i iznosila je 232,6 nm uz pripadajući indeks polidisperznosti od 0,1346. Najmanje smanjenje čestica opaženo je u uzorcima koji su sadržavali najveću koncentraciju površinski aktivnih tvari (1% Polisorbat 80; 1% Pluronic F-68). Najmanje veličine čestica rebamipida i zadovoljavajući indeksi polidisperznosti izmjereni su u uzorcima koji su sadržavali 0,25%, odnosno 0,5% površinski aktivnih tvari (2.A, 2.B, 3.A, 3.B). Također, uočava se da je kod svih koncentracija površinski aktivnih tvari manja veličina čestica u onim uzorcima gdje je korišten Polisorbat 80. Usporedba veličina čestica rebamipida prije i nakon mljevenja ovisno o udjelu površinski aktivne tvari u uzorku, kao i usporedba indeksa polidisperznosti nakon mljevenja dana je Slikom 8.



Slika 8.: Prikaz veličina čestica rebamipida prije i nakon mljevenja te indeksa polidisperznosti veličine čestice rebamipida nakon postupka vlažnog mljevenja.

Kao što je i ranije navedeno, najbolji rezultati postignuti su pri udjelima površinski aktivne tvar od 0,25, odnosno 0,5%. Indeksi polidisperznosti u tom području imaju zadovoljavajuće vrijednosti. Postupkom vlažnog mljevenja veličina čestica rebamipida smanjila se u prosjeku za 5,5 puta. U uzorcima gdje su postignuti najbolji rezultati (2.A, 2.B, 3.A, 3.B) smanjenje veličine čestica rebamipida iznosilo je između 4,3 i 5,5 puta.

Iz predloženih se rezultata može vidjeti da su na prosječne veličine čestica rebamipida i indeks polidisperznosti utjecali ne samo različiti stabilizatori, već i različiti udjeli stabilizatora u suspenzijama. Najbolji rezultat postignut je u uzorku s 0,5% Polisorbata 80 (prosječna veličina čestica 232,6 nm i indeks polidisperznosti 0,1346). U radu Matsude i suradnika, Pluronic F-68 i Polisorbat 80 korišteni su u udjelu od 1 % u suspenziji koja je sadržavala 2% rebamipida. Primjena obje površinski aktivne tvari rezultirala je česticama rebamipida manjim od 400 nm (170 nm/ Pluronic F-68, odnosno 340 nm/ Polisorbat 80).

Iako su čestice bile smanjene na nanometarske veličine, suspenzija je još uvijek imala mliječno-bijeli izgled što je bio slučaj i u ovom istraživanju. Utvrđeno je da na prozirnost suspenzije također utječe vrsta i molekularna masa korištene površinski aktivne tvari te je HPMC (TC-5)

u konačnici odabran kao dodatak formulaciji kapi za oko zbog poboljšane transparentnosti suspenzije (Matsuda i sur., 2017).

U jednom drugom istraživanju, uz ostale stabilizatore korišten je Pluronic F-68 koji je srednju veličinu čestica rebamipida smanjio na 326 nm s indeksom polidisperznosti od 0,25 (Guo i sur., 2015). Od svih korištenih stabilizatora (Pluronic F-68, HPMC K4M, HPMC E5 i PVP K30) najučinkovitiji je bio HPMC E5 uz kojeg je prosječna veličina čestica rebamipida iznosila 284 nm, a indeks polidisperznosti 0,178. Nanosuspenzije koje su sadržavale 2% i 5% HPMC E5 pridonijele su prosječnom promjeru čestica od 363 nm, odnosno 284 nm, a daljnje povećavanje udjela HPMC E5 u suspenzijama na 8% i 10% nije rezultiralo dodatnim smanjenjem veličine čestica (Guo i sur., 2015).

Određene studije sugeriraju da kombinacija celuloznih polimera i anionske površinski aktivne tvari može imati potencijalni sinergijski stabilizacijski učinak (Kawano i sur., 2017). Istraženo je da se čestice lijeka slabo topljivog u vodi učinkovito usitnjavaju metodom vlažnog mljevenja uz kombinaciju hidroksipropilceluloze (HPC) i natrijaurilsulfata (SLS). Kawano i suradnici dokazali su da se rebamid može usitniti na nanometarske dimenzije korištenjem HPC i niske koncentracije SLS-a (niža od kritične micelarne koncentracije natrijaurilsulfata koja iznosi 0,25%). Dobivene veličine čestica rebamipida iznosile su između 126,6 i 286,8 nm (Kawano i sur. 2017).

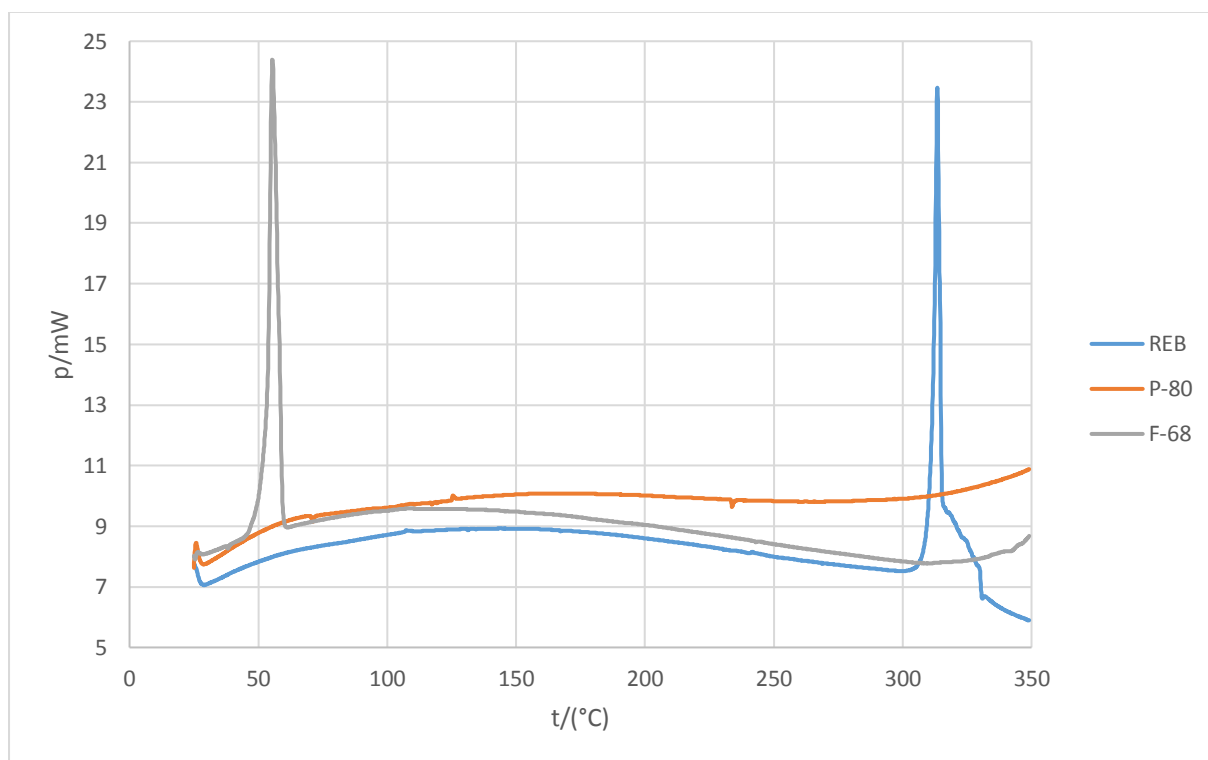
Početni problem, kratkotrajno zamućenje vida kod pacijenata nakon oftalmičke primjene 2% suspenzije rebamipida, nije riješen uporabom Polisorbata 80 i Pluronic F-68 iako su se postupkom vlažnog mljevenja dobile čestice rebamipida manje od 400 nm. Također, u pripremljenim suspenzijama uočeno je taloženje čestica tijekom stajanja te ih je bilo potrebno redispergirati. Matsuda i suradnici pripremili su 2% nanosuspenziju rebamipida s visokom prozirnošću uz korištenje površinski aktivne tvari. Pri tome su prepoznali četiri ključne točke o kojima ovisi konačni ishod: odabir površinski aktivne tvari tijekom neutralizacijske kristalizacije (1), utvrđivanje procesnih parametara neutralizacijske kristalizacije (2), upotreba disperzijske metode (disperzija postignuta brzim smicanjem tekućina-tekućina) (3) te dijaliza dispergirane suspenzije rebamipida kako bi se dobila ultra-fina suspenzija (4) (Matsuda i sur., 2017).

4.2. DIFERENCIJALNA PRETRAŽNA KALORIMETRIJA

Uzorci liofiliziranog rebamipida (2-5 mg) odvagnuti su u aluminijske posudice, a termogram je snimljen pri brzini zagrijavanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ u temperaturnom rasponu od 30 do $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Udio kristalinične frakcije lijeka u uzorcima (engl. *relative drug cristallinity*, RDC) izračunat je prema jednadžbi:

$$RDC = \frac{\Delta H_{\text{uzorak}}}{\Delta H_{\text{lijek}}} \times 100\%$$

gdje su ΔH_{uzorak} i ΔH_{lijek} izmjerene vrijednosti entalpije taljenja lijeka za uzorak i kristalinični lijek, normirane s obzirom na sadržaj lijeka u uzorku. Sva mjerenja su rađena u duplikatu.

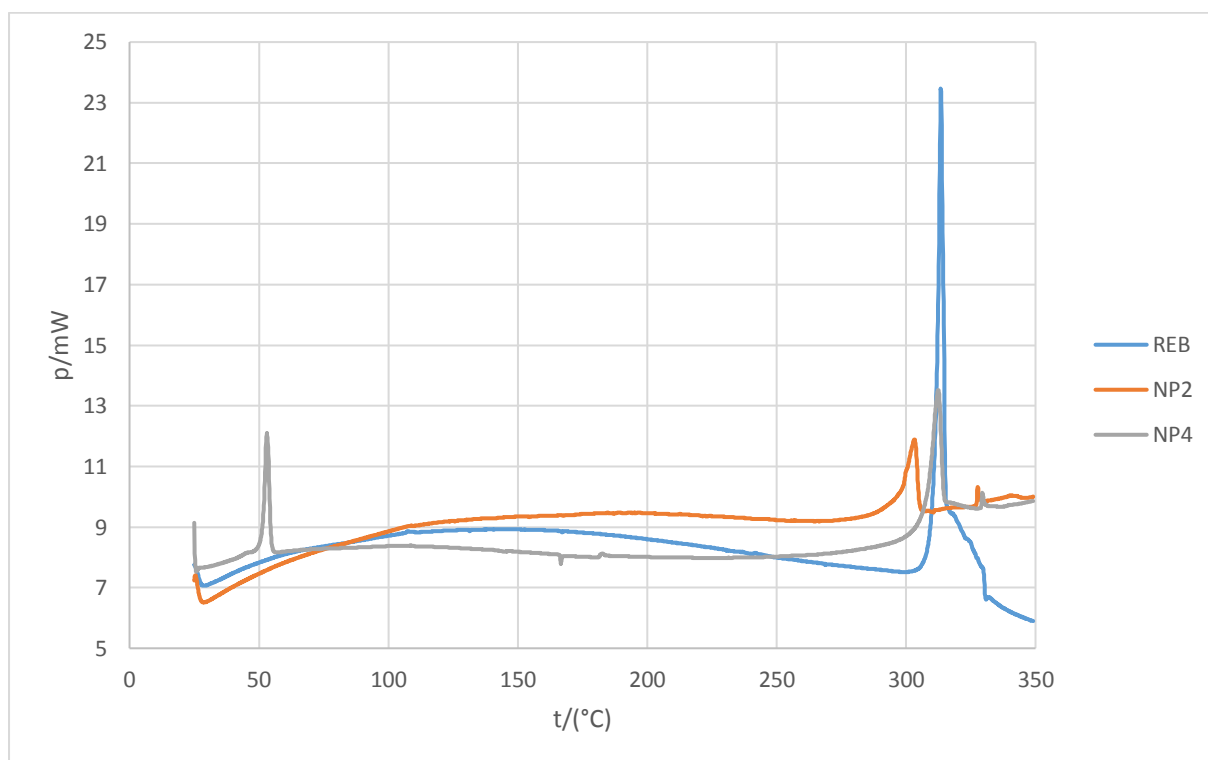


Slika 9. DSC termogrami čistih komponenata- lijek (REB), polisorbat 80 (P-80) i poloksamer (F-68).

Na Slici 9 prikazani su termogrami rebamipida i ispitivanih površinski aktivnih tvari. Termogram rebamipida pokazuje oštar pik taljenja lijeka pri $311,35^{\circ}\text{C}$ što je u skladu s literaturnim podacima. Različiti izvori navode da je talište ovog lijeka u rasponu temperatura od 296 do 306°C te varira zavisno o karakteristikama ispitivanog uzorka (raspodjela veličina čestica) te korištenoj aparaturi kod mjerenja (Tung i sur., 2011; Park i sur. 2013; Guo i sur.,

2015). U termogramu polisorbata 80 se u ispitivanom području temperatura ne opažaju značajniji termički događaji, dok se u termogramu poloksamera 68 opaža oštar pik pri 53,22 °C koji odgovara taljenju tvari, što je u skladu s deklaracijom proizvođača.

Na Slici 10 prikazani su termogrami odabranih uzoraka nanočestica koje su pripremljene korištenjem polisorbata 80 i poloksamera 68. Riječ je o uzorku rebamipida koji su pripremljeni mljevenjem pri masenom omjeru lijeka i površinski aktivne tvari 4:1. U termogramima navedenih uzoraka, pik taljenja lijeka se javlja pri nešto nižim temperaturama u odnosu na onaj u uzorku čistog lijeka, što se pripisuje prisustvu površinski aktivnih tvari te usitnjavanju kristala lijeka na nanometarsku veličinu (Tomić i sur., 2019). I za ostale uzorke nanokristala dobiveni su slični termogrami (podaci nisu prikazani). Prisustvo pika taljenja u termogramima mljevenih uzoraka potvrđuje prisustvo kristalinične faze u uzorku, tj nastajanje nanokristala. Pri tome, površina ispod pika taljenja u termogramu proporcionalna je sadržaju kristalinične faze u uzorku. Temeljem toga izračunat je sadržaj kristalinične faze u svakom od ispitivanih uzorka, a rezultati su prikazani u Tablici 7.

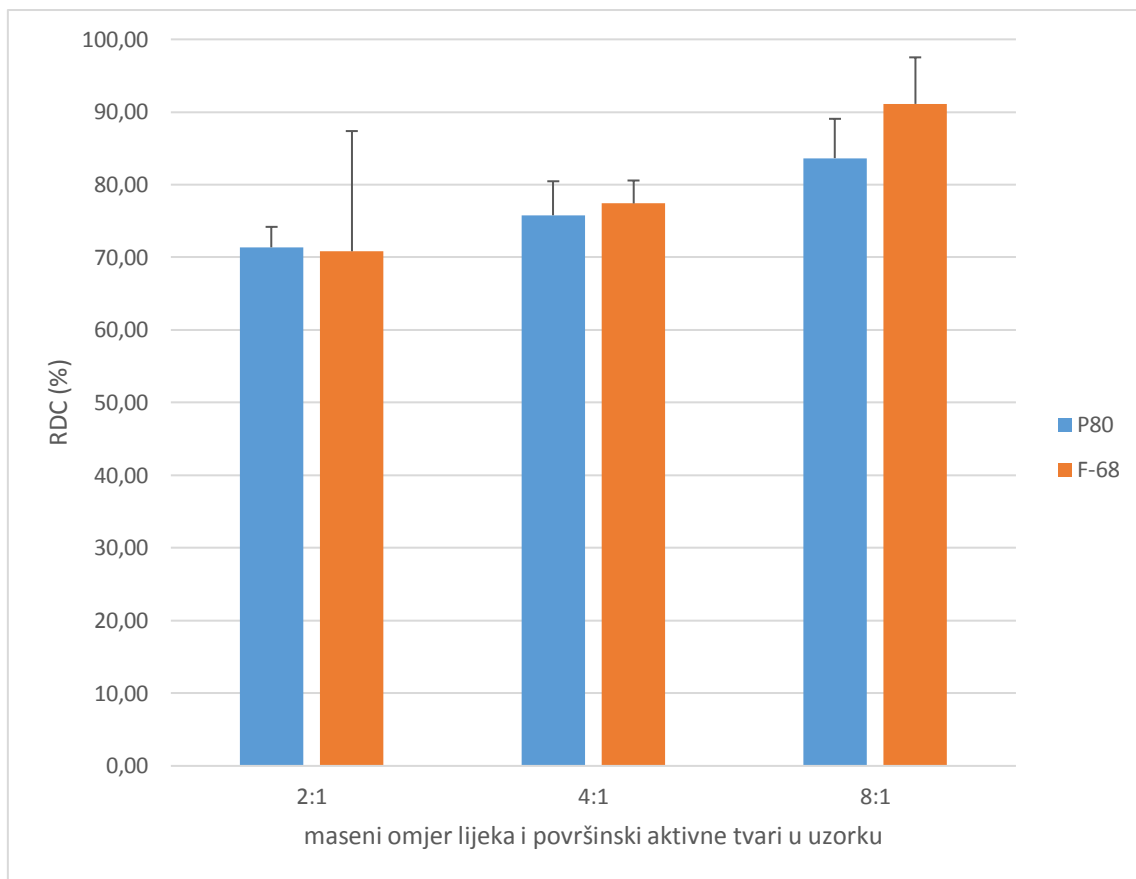


Slika 10. DSC termogrami lijeka i nanokristala lijeka pripremljenih mljevenjem pri masenom omjeru lijeka i površinski aktivne tvari 4:1.

Tablica 7. Pregled termičkih karakteristika ispitivanih uzoraka (talište, T_{onset} i entalpija taljenja uzorka ΔH_{fus}) i relativna kristaliničnost lijeka u uzorcima (RDC).

Uzorak	PAT	T_{onset} (°C)	T_{peak} (°C)	ΔH_{fus} (J/g)	RDC (%)
RBP	-	311,4±0,3	313,0±0,6	132,2±10,1	100,0±7,7
F-68	-	53,22±0,4	55,42±0,7	132,9	-
P 80	-	-	-	-	-
4.A	1% P80	300,6±0,9	305,6±1,5	66,8±4,1	71,4±2,9
3.A	0,5% P80	299,7±2,2	304,7±1,8	73,7±2,9	75,8±4,7
2.A	0,25% P80	303,8±1,7	307,3±0,9	98,3±6,3	83,7±5,4
4.B	1% F-68	308,5±0,6	309,8±0,4	70,4±15,8	70,8±16,5
3.B	0,5% F-68	306,8±0,7	310,2±1,1	74,9±17,5	77,4±3,2
2.B	0,25% F-68	306,9±1,2	310,2±0,5	107,0±7,5	91,1±6,4

Na Slici 11 prikazana je relativna kristaliničnost lijeka u zavisnosti o masenom omjeru lijeka i površinski aktivne tvari u uzorcima tijekom mljevenja. Vidljivo je da smanjenje udjela površinski aktivne tvari u tretiranim uzorcima rezultira porastom kristalinične frakcije lijeka, tj. dolazi do uspješnijeg prevođenog lijeka u nanokristale. Očito je da se koncentracija površinski aktivne tvari prilikom mljevenja mora pažljivo optimirati, kako bi bila dostatna da interakcijom s površinom nanokristala spriječi njihovo agregaciju. Međutim, ukoliko je koncentracija površinski aktivne tvari u sustavu previsoka, dolazi do micelarne solubilizacije lijeka. Frakcija lijeka koja je uklopljena u micele nakon liofilizacije prelazi u amorfan oblik, te je stoga uspješnost konverzije polaznog materijala u nanokristale manje uspješna.



Slika 11. Ovisnost relativne kristaliničnosti lijeka u ispitivanim uzorcima u ovisnosti o masenom omjeru lijeka i površinski aktivne tvari koja je korištena prilikom mljevenja.

5. ZAKLJUČAK

U eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada pripremljene su 2% nanosuspenzije čestica rebamipida i površinski aktivnih tvari Polisorbat 80, odnosno Pluronic F-68. Usitnjavanje čestica do nanometarskih veličina provedeno je metodom vlažnog mljevenja, a veličina čestica kao i indeks polidisperznosti izmjereni su postupkom fotonske korelacijske spektroskopije. Iz dobivenih je rezultata uočeno da su na veličine čestica utjecali i vrsta i udio površinski aktivnih tvari.

Tako su u nanosuspenzijama gdje je dodan Polisorbat 80 čestice bile manje nego u uzorcima gdje je dodan Pluronic F-68. U svim uzorcima čestice su bile manje od 400 nm pa se može zaključiti da je postupak usitnjavanja čestica rebamipida bio uspješan. Smanjenje čestica prije i nakon mljevenja iznosilo je oko pet puta, a najbolji rezultat postignut je u uzorku koji je sadržavao 0,5% Polisorbata 80 (prosječna veličina čestica 232,6 nm). Indeksi polidisperznosti bili su najniži u uzorcima koji su sadržavali 0,25% (PDI 0,10) i 0,5% (0,14) površinski aktivnih tvari.

Unatoč takvim rezultatima izgled nanosuspenzije i dalje je ostao mliječno-bijeli što je bio glavni problem pri primjeni takvog gotovog lijeka u obliku suspenzijskih kapi za oko. Nadalje, pohranom nanosuspenzije pri sobnoj temperaturi nastupa taloženje čestica rebamipida te je nanosuspenzije bilo potrebno redispergirati. Iz dobivenih rezultata i istraživanja koja su objavljena u drugim radovima, zaključeno je da bi se formulacije visoke providnosti mogle proizvesti uz druge površinski aktivne tvari i metode usitnjavanja. Metoda vlažnog mljevenja te Polisorbat 80 i Pluronic F-68 mogu biti korisne u izradi nanosuspenzija kod kojih nije bitna visoka providnosti.

Nadalje, provedena je diferencijalna pretražna kalorimetrija liofiliziranih uzoraka rebamipida. Snimljen je termogram i izračunat udio kristalinične frakcije lijeka u uzorcima. Talište čistog rebamipida odgovaralo je podacima iz literature, dok je u nanosuspenzijama pik taljenja bio pri nižim temperaturama. Potvrđeno je prisustvo kristalinične faze u uzorku, a za određivanje sadržaja kristalinične faze u uzroku korištena je površina ispod pika taljenja u termogramu. Iz takvih je rezultata zaključeno da manji udio površinski aktivnih tvari u uzorku posljedično uzrokuje porast kristalinične frakcije lijeka, tj. dolazi do uspješnijeg prevođenja čestica rebamipida u nanokristale.

Iz svega navedenog zaključeno je da najbolje karakteristike (veličina čestica, indeks polidisperznosti, udio kristalinične faze) imaju uzorci u kojima je udio površinski aktivne tvari 0,25%, odnosno 0,5%. Ipak, izgled nanosuspenzije i taloženje čestica ostao je u ovom eksperimentalnom dijelu neprevladani problem.

6. LITERATURA

Ali HSM, York P, Ali AMA, Blagden N. Hydrocortisone nanosuspensions for ophthalmic delivery: a comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling. *J Control Rel*, 2011, 149(2), 175–181.

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, and Crison JR, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification – the Correlation of in-Vitro Drug Product Dissolution and in-Vivo Bioavailability. *Pharmaceut Res*, 1995, 12, 413–420.

Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry. Oxford, UK, 2014., str. 890-891.

Bron A, Tiffany J, Gouveia S, Yokoi N, Voon L. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3), 347–60.

Camasmie Peters MC, Neto ES, Monteiro LM, Yukuyama MN, Mendes Machado MG, Fernandes de Oliveira I, Ambrosio Zanin MH, Löbenberg, Bou-Chacra N. Advances in ophthalmic preparation: the role of drug nanocrystals and lipid-based nanosystems. *J Drug Targeting*, 2019, 28, 259-270.

Cunha-Vaz J. The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol*, 1976, 41(2), 287–327.

de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WL. Bottom-up preparation techniques for nanocrystals of lipophilic drugs. *Pharm Res*, 2011, 28(5), 1220–3.

Deguchi S, Otake H, Nakazawa Y, Hiramatsu N, Yamamoto N, Nagai N. Ophthalmic formulation containing nilvadipine nanoparticles prevents retinal dysfunction in rats injected with streptozotocin. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12), 2720.

Ely DR, Garcia RE, Thommes M. Ostwald-Freundlich diffusion-limited dissolution kinetics of nanoparticles. *Powder Technol*, 2014, 257, 120-123.

Fangueiro J, Veiga F, Silva A, Souto E. Ocular drug delivery-new strategies for targeting anterior and posterior segments of the eye. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(9), 1135–46.

Gao L, Zhang DR, Chen MH. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res*, 2008, 10, 845–862.

Grass GM, Robinson JR. Mechanisms of corneal drug penetration I: in vivo and in vitro kinetics. *J Pharm Sci*, 1988, 77(1), 3–14.

Guo Y, Wang Y, Xu L. Enhanced bioavailability of rebamipide nanocrystal tablets: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10, 223-229.

Holland E, Mannis M, Lee WB. Ocular surface disease: cornea, conjunctiva and tear film. London: Elsevier Health Sciences, 2013.

Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. Farmaceutika. Zagreb, Školska knjiga, 1998, str. 50-51.

Junghanns JUAH, Muller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomed*, 2008, 3, 295–309.

Junghanns JUAH. Pharmazeutische Technologie. Berlin: Freie Universität, 2006, doktorski rad

Kashima T, Itakura H, Akiyama H, Kishi S. Rebamipide ophtalmic suspension for the treatment of dry eye syndrome: a critical appraisal. *Clin Ophtalmol*, 2014, 8, 1003-1010.

Kassem MA, Abdel Rahman AA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM. Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm*, 2007, 340(1–2), 126–133.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 11. izdanje, 2011, str. 8.

Kawano Y, Ishii N, Shimizu Y, Hanawa T. Development and Characterisation of a Suspension Containing Nanoparticulated Rebamipide for a Mouth Wash for Stomatitis. *J Pharm Sci Tehnol Jap*, 2017, 77 (2), 104-115.

K-i H, Lee VH, Kim K-J. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60(2), 227–40.

Kim JH, Jang SW, Han SD, Hwang HD, Choi H-G. Development of a novel ophthalmic ciclosporin A-loaded nanosuspension using top-down media milling methods. *Pharmazie*, 2011, 66(7), 491–5.

Krause K, Müller R. Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenisation. *Int J Pharm*, 2001, 214(1), 21–4.

Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res*, 2014, 55(2), 289–298.

List MA, Sucker H. Pat No. GB 2200048. Velika Britanija, 1988.

Liu P. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs. Nanocrystal formulation for poorly soluble drugs, University of Helsinki, 2013, doktorski rad.

Lobenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50, 3–12.

Lovrić J, Hafner A, Radiković M, Juretić M, Dürriegl M, Perina Lakoš G, Pepić I. Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva. *Farm Glas*, 2015, 71, 355-384.

Matsuda T, Hiraoka S, Urashima H, Ogura A, Ishida T. Preparation of an Ultrafine Rebamipide Ophthalmic Suspension with High Transparency. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40, 665-674.

Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Copper ER. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharma Sci*, 2003, 18, 113–20.

Moschwitz JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm*, 2013, 453, 142–56.

Muller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products, in *Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications*, A. Prokop, Editor. 2011, Springer Science+Business Media: Berlin. p. 411–432.

Nagai N, Ito Y, Okamoto N, Shimomura Y. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability. *Toxicology*, 2014, 319, 53–62.

Nagai N, Yoshioka C, Mano Y, Tnabe W, Ito Y, Okamoto N. A nanoparticle formulation of disulfiram prolongs corneal resi-dence time of the drug and reduces intraocular pressure. *Exp Eye Res*, 2015, 132, 115–23.

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Interview form of Mucosta® ophtalmic suspension UD2%, 5, 2015.

Park CW, Tung NT, Rhee YS, Kim JY, Oh TO, Ha JM, Chi SC, Park ES. Physicochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations of novel ternary solid dispersion of rebamipide with poloxamer 407. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 39 (6), 836-844.

Popov A, Enlow EM, Bourassa J, Gardner CR, Chen H, Ensign LM. Inventors; The Johns Hopkins University, assignee.410 Nanocrystals, compositions, and methods that aid particle trans-port in mucus. Baltimore, MD. US 9056057. 2013.

Ravichandran R. Nanoparticles in drug delivery: potential green nanobiomedicine applications. *Int J Green Nanotechnol Biomed*, 2009, 1(2), B108–30.

Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso M, de la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95, 279–93.

Romero GB, Keck CM, Müller RH. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int J Pharm*, 2016, 501, 239-244

Sanchez-Lopez E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, Garcia ML. Lipidnanoparticles (SLN, NLC): overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye—Part I—Barriers and determining factors in ocular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 110, 70–75.

Sharma OP, Patel V, Mehta T. Nanocrystal for ocular drug delivery: hope or hype. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6, 399–413.

Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: industrially feasible multi functional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm*, 2010, 399(1), 129–39.

Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State MaterSci*, 2012, 16(6), 295–301.

Takeji Y, Nakashima H, Kagawa Y, Urashima H, Shinohara H. Effect of rebamipide ophthalmic suspension on capsaicin-induced corneal epithelial damage in rats. *Atarashii Ganka*, 2013, 30, 1309–1313.

Tomić I, Juretić M, Jug M, Pepić I, Cetina Čizmek B, Filipović-Grčić J. Preparation of in situ hydrogels loaded with azelaic acid nanocrystals and their dermal application performance study. *Int J Pharm*, 2019, 563, 249–258

Tung NT, Park CW, Oh T, Kim JY, Ha JM, Rhee YS, Park ES. Formulation of solid dispersion of rebamipide evaluated in a rat model for improved bioavailability and efficacy. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63, 1539–1547

Tunick MH, Van Hecken DL, Cooke PH, Malin EL. Transmission electron microscopy of mozzarella cheeses made from microfluidized milk. *J Agric Food Chem*, 2002, 50, 99–103.

Tuomela A, Liu P, Puranen J, Rönkkö S, Laaksonen T, Kalesnykas G, Oksala O, Ilkka J, Laru J, Järvinen K, Hirvonen J, Peltonen L. Brinzolamide nanocrystal formulations for ophthalmic delivery: reduction of elevated intraocular pressure in vivo. *Int J Pharm*, 2014, 467(1–2), 34–41.

Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(11), 1131–5.

Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release*, 2013, 172(3), 1126–41.

Weng Y, Liu J, Jin S, Guo W, Liang X, Hu Z. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(3), 281–291.

Ye T, Yuan K, Zhang W, Song S, Chen F, Yang X. Prodrugs incorporated into nanotechnology-based drug delivery systems for possible improvement in bioavailability of ocular drugs delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2013, 8(4), 207–17.

Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, Li XR, Beuerman RW. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics*. 2012, 75(13), 3877–3885.

7. SAŽETAK

Tehnologija nanokristala intenzivno se razvija te se njezinom primjenom u farmaceutskoj industriji nastoje poboljšati biofarmaceutska i farmaceutsko-tehnološka svojstva djelatnih tvari. Nanokristali su čestice veličine od 1 do 1000 nm te povećavaju brzinu otapanja povećanjem specifične površine tvari. Metoda proizvodnje nanokristala ovisi o fizikalno-kemijskoj prirodi djelatne tvari, a dvije glavne skupine metoda izrade su metoda smanjenja veličina čestica (engl. *top-down methods*) i metoda povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up methods*). Složenost strukture oka predstavlja ograničenje za isporuku lijekova te su se formulacije temeljene na nanokristalima pokazale uspješnima u postizanju povećanja vremena zadržavanja, bioraspoloživosti i propusnosti lijekova kroz očne barijere. Za liječenje problema suhog oka na tržištu je dostupna 2% suspenzija rebamipida koja nakon primjene uzrokuje kratkotrajno zamućenje vida zbog mliječno-bijelog izgleda.

U ovom radu pripravljene su nanosuspenzije rebamipida uz dodatak površinski aktivnih tvari Polisorbat 80 i Pluronic F-68 u različitim udjelima. Nanosuspenzije su izrađene metodom vlažnog mljevenja te je postupkom fotonske korelacijske spektroskopije i pretražne diferencijalne kalorimetrije izmjerena veličina čestica, indeks polidisperznosti i udio kristalinične frakcije lijeka. Iz dobivenih je rezultata zaključeno da su najbolji rezultati postignuti u nanosuspenzijama koje su sadržavale 0,25%, odnosno 0,5% površinski aktivne tvari. Izgled nanosuspenzije ostao je i dalje mliječno-bijeli unatoč tome što je u svim uzorcima veličina čestica bila manja od 400 nm. Stoga za postizanje veće providnosti treba upotrijebiti druge metode izrade i/ili površinski aktivne tvari.

SUMMARY

Nanocrystal technology is intensely being developed and with its application in the pharmaceutical industry, the biopharmaceutical and pharmaceutical-technological properties of active ingredients are trying to be improved. Nanocrystals are particles with size from 1 to 1000 nm and they increase the dissolution rate by increasing the specific surface area. The method of nanocrystal production depends on the physicochemical nature of the active ingredient, but the two main groups of methods are methods that decrease the particle size (top-down methods) and methods that increase the particle size (bottom-up methods). The complexity of the eye structure presents as the limit for the drug delivery and formulations based on nanocrystals have shown themselves successful in achieving increased retention time, bioavailability and drug permeability through barriers of the eye. For the dry eye treatment a 2% rebamipide suspension is available on the market which after its application causes short-term blurred vision because of its milky-white appearance.

In this study rebamipide nanosuspensions have been made with the addition of surfactants Polisorbate 80 and Pluronic F-68 in different ratios. The nanosuspensions were made using the wet grinding method and using the photon correlation spectroscopy procedure, as well as differential scanning calorimetry, the particle size, polydispersity index and proportion of the crystalline fraction of the drug were measured. From the collected results it was concluded that the best results were accomplished in nanosuspensions that contained 0.25% and 0.5% of surfactants. The appearance of the nanosuspension remained milky-white despite the fact that in all samples the particle size was smaller than 400 nm. Therefore, to accomplish better transparency other methods and/or surfactants should be used.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA NANOKRISTALA REBAMIPIDA

Filip Franjković

SAŽETAK

Tehnologija nanokristala intenzivno se razvija te se njezinom primjenom u farmaceutskoj industriji nastoje poboljšati biofarmaceutska i farmaceutsko-tehnološka svojstva djelatnih tvari. Nanokristali su čestice veličine od 1 do 1000 nm te povećavaju brzinu otapanja povećanjem specifične površine tvari. Metoda proizvodnje nanokristala ovisi o fizikalno-kemijskoj prirodi djelatne tvari, a dvije glavne skupine metoda izrade su metoda smanjenja veličina čestica (engl. *top-down methods*) i metoda povećanja veličine čestica (engl. *bottom-up methods*). Složenost strukture oka predstavlja ograničenje za isporuku lijekova te su se formulacije temeljene na nanokristalima pokazale uspješnim u postizanju povećanja vremena zadržavanja, bioraspoloživosti i propusnosti lijekova kroz očne barijere. Za liječenje problema suhog oka na tržištu je dostupna 2% suspenzija rebamipida koja nakon primjene uzrokuje kratkotrajno zamućenje vida zbog mliječno-bijelog izgleda. U ovom radu pripravljene su nanosuspenzije rebamipida uz dodatak površinski aktivnih tvari Polisorbat 80 i Pluronic F-68 u različitim udjelima. Nanosuspenzije su izrađene metodom vlažnog mljevenja te je izmjerena veličina čestica, indeks polidisperznosti i udio kristalinične frakcije lijeka. Iz dobivenih je rezultata zaključeno da su najbolji rezultati postignuti u nanosuspenzijama koje su sadržavale 0,25%, odnosno 0,5% površinski aktivne tvari. Izgled nanosuspenzije ostao je i dalje mliječno-bijeli unatoč tome što je u svim uzorcima veličina čestica bila manja od 400 nm.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 11 grafičkih prikaza, 7 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanokristali, nanosuspenzije, rebamipid

Mentor: **Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mario Jug, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study of Pharmacy
Department of pharmaceutical technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF REBAMIPIDE NANOCRYSTALS

Filip Franjković

SUMMARY

Nanocrystal technology is intensely being developed and with its application in the pharmaceutical industry, the biopharmaceutical and pharmaceutical-technological properties of active ingredients are trying to be improved. Nanocrystals are particles with size from 1 to 1000 nm and they increase the dissolution rate by increasing the specific surface area. The method of nanocrystal production depends on the physicochemical nature of the active ingredient, but the two main groups of methods are methods that decrease the particle size (top-down methods) and methods that increase the particle size (bottom-up methods). The complexity of the eye structure presents as the limit for the drug delivery and formulations based on nanocrystals have shown themselves successful in achieving increased retention time, bioavailability and drug permeability through barriers of the eye. For the dry eye treatment a 2% rebamipide suspension is available on the market which after its application causes short-term blurred vision because of its milky-white appearance. In this study rebamipide nanosuspensions have been made with the addition of surfactants Polisorbate 80 and Pluronic F-68 in different ratios. The nanosuspensions were made using the wet grinding method and the particle size, polydispersity index and proportion of the crystalline fraction of the drug were measured. From the collected results it was concluded that the best results were accomplished in nanosuspensions that contained 0.25% and 0.5% of surfactants. The appearance of the nanosuspension remained milky-white despite the fact that in all samples the particle size was lesser than 400 nm.

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

Thesis includes: 39 pages, 11 figures, 7 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanocrystals, nanosuspensions, rebamipide

Mentor: **Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivan Pepić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Jug, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2020.