

Razvoj oftalmičkih nanoemulzija sa stearylaminom

Bračko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:844354>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Bračko

**Razvoj oftalmičkih nanoemulzija sa
stearilaminom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na uloženom vremenu, trudu, savjetovanju te na prenesenom znanju i stručnom vodstvu prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se Biseri Jurišić Dukovski, mag. pharm., na pruženoj pomoći, uloženom trudu i podršci prilikom provođenja eksperimentalnog dijela i pri pisanju ovoga rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, Nikoli i obitelji na neizmjernoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanoemulzije	1
1.2. Metode izrade nanoemulzija	2
1.2.1. Visokoenergetske metode	3
1.2.2. Niskoenergetske metode	3
1.3. Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija	5
1.4. Stabilnost nanoemulzija	6
1.5. Primjena nanoemulzija u farmaciji	7
1.6. Komponente nanoemulzija.....	7
1.6.1. Ulja/lipidi	7
1.6.2. Surfaktanti i kosurfaktanti	7
1.6.3. Konzervansi, antioksidansi i ostali stabilizatori	8
1.7. Topikalna oftalmička primjena	8
1.7.1. Barijere prednjeg segmenta oka	9
1.7.2. Nanoemulzije u oftalmičkoj primjeni lijekova.....	10
1.8. Kationske nanoemulzije u oftalmičkoj primjeni	11
1.8.1. Kationski surfaktanti i polimeri kao nositelji pozitivnog naboja	12
1.9. Ispitivanje biokompatibilnosti oftalmičkih formulacija tijekom razvoja lijeka	13
1.10. Mukoadhezija.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Materijali	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Izrada nanoemulzija sa stearylaminom	20
3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti	20

3.2.3. Mjerenje zeta – potencijala	21
3.2.4. Mjerenje pH nanoemulzija	21
3.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija	22
3.2.6. Metoda i uvjeti izrade <i>in vitro</i> modela epitela rožnice	22
3.2.7. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija	23
3.2.8. Reološka mjerenja	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Priprava nanoemulzija sa stearylaminom	25
4.2. Veličina kapljica	26
4.3. Indeks polidisperznosti (PDI)	27
4.4. Zeta – potencijal	28
4.5. pH vrijednost	28
4.6. Stabilnost nanoemulzija	29
4.7. Biokompatibilnost nanoemulzija	32
4.8. Mukoadhezija	33
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA	37
7. SAŽETAK/ SUMMARY	41
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	

1.UVOD

1.1.Nanoemulzije

Nanoemulzije se definiraju kao koloidne disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a čiji nastanak i stabilnost osigurava odgovarajući surfaktant (Singh i sur., 2017). Tipična nanoemulzija se sastoji od vode, ulja i surfaktanta, pri čemu se surfaktant nakuplja na graničnoj površini ulje/voda te smanjuje međupovršinsku napetost na granici faza (Gupta i sur., 2016). Razlikujemo 3 tipa nanoemulzija: U/V tip - u kojem je unutarnja faza (disperzna faza ili diskontinuirana faza) ulje, a vanjska faza (disperzno sredstvo ili kontinuirana faza) voda, V/U tip u kojem je voda dispergirana u ulju te višestruke V/U/V nanoemulzije koje nisu toliko česte. Veličina kapljica unutarnje faze kod nanoemulzija manja je od 500 nm. Mikroemulzije imaju sličnu veličinu kapljica unutarnje faze te mogu biti bistre ili blago opalescirajućeg izgleda, ali se značajno razlikuju od nanoemulzija u strukturnim aspektima i u termodinamičkoj stabilnosti. Mikroemulzije nastaju spontano (ovisno o temperaturi, tlaku i sastavu) i termodinamički su stabilne, dok je nanoemulzijama potrebna energija za njihov nastanak i termodinamički su nestabilne. Također, bitna razlika je što je za formiranje nanoemulzija potrebna niža koncentracija surfaktanta nego za formiranje mikroemulzija, a što im je prednost (García-Celma i sur., 2016 ; Anton i Vandam, 2011).

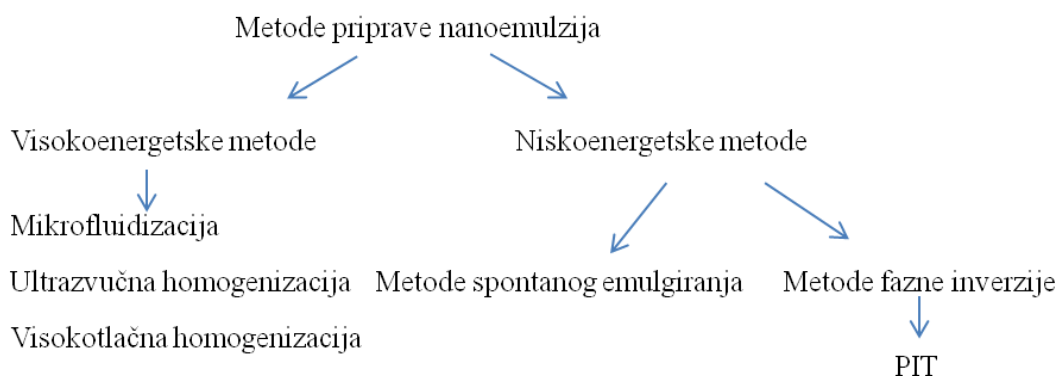
Tablica 1. Usporedba makroemulzija, nanoemulzija i mikroemulzija (Gupta i sur., 2016).

	Makroemulzije	Nanoemulzije	Mikroemulzije
Veličina	1-100 μm	20-500 nm	10-100 nm
Stabilnost	Termodinamički nestabilne, kinetički slabo stabilne	Termodinamički nestabilne, kinetički stabilne	Termodinamički stabilne
Metoda pripreme	Visoko- i niskoenergetske metode	Visoko- i niskoenergetske metode	Niskoenergetske metode
Polidisperznost	Često visoka (>40%)	Uobičajeno niska (10-20%)	Uobičajeno niska (<10%)

S obzirom na površinski naboj kapljica, nanoemulzije se dijele na neutralne, anionske i kationske. Kapljice nanoemulzije mogu biti obložene trajno nabijenim molekulama ili s molekulama koje posjeduju funkcionalne skupine koje mogu ionizirati. Postojeće elektrokemijske teorije opisuju kako se ioni suprotnog naboja u vanjskoj fazi premještaju u blizinu kapljice kako bi neutralizirale višak naboja koji se nalazi na površini kapljice, tvoreći električni dvosloj (García-Celma i sur., 2016). Unutrašnji sloj toga dvosloja naziva se Sternov sloj gdje su suprotno nabijeni ioni čvrsto vezani na površinu kapljice, a vanjski sloj električnog dvosloja se naziva difuzijski sloj gdje su ioni slabije vezani na površinu kapljice te je taj sloj pomičan (Gouy-Chapmanov sloj). U difuzijskom sloju postoji imaginarna granica unutar koje je Sternov sloj te dio "vezanih" iona difuzijskog sloja koji u električnom polju putuju prema elektrodi suprotnog naboja zajedno s nabijenom česticom. Oni ioni koji se nalaze izvan zamišljene granice ne gibaju se s česticom. Potencijal na „granici“ odnosno na plohi smicanja je zeta-potencijal. Vrijednost zeta-potencijala govori o stabilnosti nanoemulzije, a može se odrediti iz elektroforetske pokretljivosti kapljica. Visoko pozitivan ili visoko negativan zeta-potencijal na površini čestica uzrokovat će njihovo međusobno odbijanje. U odsutnosti steričke stabilizacije kapljica, generalno je prihvaćeno da je potrebna vrijednost zeta-potencijala pozitivnija od +30 mV ili negativnija od -30 mV kako bi disperzija bila stabilna (García-Celma i sur., 2016).

1.2. Metode izrade nanoemulzija

Najvažniji kriterij u pripravi nanoemulzija je dobivanje željene veličine kapljica s monomodalnom raspodjelom. Za pripravu nanoemulzija potrebna je energija. Ovisno o izvoru te energije metode pripreme nanoemulzija dijele se u dvije skupine: visokoenergetske i niskoenergetske metode (Singh i sur., 2017).



Slika 1. Shematska klasifikacija metoda izrade nanoemulzija (preuzeto iz García-Celma i sur., 2016)

1.2.1. Visokoenergetske metode

Kod visokoenergetskih metoda potrebna je energija dobivena od vanjskog izvora kao što su mehanički uređaji, poput mikrofluidizatora, ultrazvučnog homogenizatora i visokotlačnog homogenizatora. Njihova prednost je upravo ta da je moguće koristiti gotovo svako ulje u izradi nanoemulzija tim metodama. Ti mehanički uređaji će proizvesti snažne sile koje razbijaju uljnu i vodenu fazu u sitne kapljice. Najveći nedostatak su visoka cijena uređaja te zagrijavanje tijekom priprave uslijed oslobađanja toplinske energije, što onemogućuje uklapanje pojedinih termolabilnih djelatnih tvari tim metodama (Singh i sur., 2017).

Smanjenje veličine kapljica pomoću mikrofluidizatora postiže se zbog istovremenog hidrauličnog smicanja, udara, trenja, intenzivne turbulencije i kavitacije. Princip rada uključuje potiskivanje grube emulzije kroz interakcijsku komoru s mikrokanalima pod utjecajem visokotlačne pumpe čime se postiže velika brzina protjecanja te velike sile smicanja u dodiru sa stijenkama mikrokanala i sile međusobnog sudaranja kapljica emulzije. Provodi se više ciklusa usitnjavanja kapljica (ponekad do 100 ciklusa) (Singh i sur., 2017).

Ultrazvučna homogenizacija posredovana je zvučnim valovima visokih frekvencija (20 kHz i više). Ultrazvučni homogenizator sastoji se od piezoelektrične sonde, koja primjenjenu struju pretvara u ultrazvučne valove, a zatim ti ultrazvučni valovi stvaraju kavitacijske mjehuriće koji rastu, ali su nestabilni i implodiraju čime uzrokuju smanjenje veličine kapljica unutarnje faze. U usporedbi s drugim metodama visoke energije, ultrazvučna homogenizacija zahtijeva najmanje energije (Singh i sur., 2017).

Visokotlačni homogenizatori imaju sličan princip rada kao i mikrofluidizatori. Visokotlačna pumpa velikom brzinom tjera emulziju kroz vrlo sitan otvor gdje dolazi do razbijanja kapljica u manje kapljice pod utjecajem velike sile smicanja. Proces se također ponavlja do zadovoljavajuće veličine kapljica, kao i kod mikrofluidizatora (Gupta i sur., 2016).

1.2.2. Niskoenergetske metode

Kod niskoenergetskih metoda energija potrebna za nastanak nanoemulzija potječe od kemijskog potencijala komponenti samog sustava. Veličina dobivenih kapljica kod visokoenergetskih metoda ovisi o količini utrošene energije, dok kod niskoenergetskih metoda veličina ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima sustava. Nanoemulzije pripremljene niskoenergetskim metodama razvijene su nakon proučavanja kumulativnog ponašanja ulja, surfaktanta, kosurfaktanta, djelatne tvari, vodene faze, hidrofilno-lipofilne ravnoteže (HLB

vrijednosti) surfaktanta i temperature. Nedostatak tih metoda je ograničavajući izbor ulja i surfaktanata koji se mogu koristiti (Singh i sur., 2017).

Prednost niskoenergetskih metoda u usporedbi s visokoenergetskim metodama je ekonomska isplativost jer njihova priprava ne zahtijeva korištenje skupih uređaja te mogućnost uklapanja termolabilnih djelatnih tvari i drugih osjetljivih djelatnih tvari kao što su proteini i nukleinske kiseline jer pri pripravi nanoemulzija ne dolazi do zagrijavanja zbog primjene velike mehaničke energije i oslobađanja toplinske energije. Isto tako uglavnom rezultiraju nanoemulzijama manje veličine kapljica od onih dobivenih visokoenergetskim metodama (García-Celma i sur., 2016). Dije se na metode spontanog emulgiranja i metode fazne inverzije.

Spontano emulgiranje je proces koji uključuje pripremu dviju faza, vodene faze u kojoj se nalazi hidrofilni surfaktant te organske ili uljne faze koja sadrži djelatnu tvar, surfaktant topiv u ulju i organsko otapalo koje se djelomično miješa. Uljna faza se dodaje kap po kap u vodenu fazu čime dolazi do difuzije organskog otapala u vodenu fazu ostavljajući za sobom sitne kapljice uljne faze koje odmah bivaju prekrivene molekulama surfaktanta. Ponekad je potrebno blago miješanje na magnetskoj mješalici. Također je moguće i dodavanje vodene faze u uljnu fazu. Za pripremu jako malih kapljica obično je potreban veći udio organskog otapala u uljnoj fazi (Singh i sur., 2017).

Metoda fazne inverzije za razliku od ostalih započinje V/U makroemulzijom koja se zatim transformira u U/V nanoemulziju zbog promjena u sastavu ili u temperaturi (Gupta i sur., 2016). Najčešće korištena metoda ove vrste je metoda temperature fazne inverzije (eng. *phase inversion temperature*, PIT). Obično se smjesa ulja, vode i surfaktanta zagrijava na prethodno određenu temperaturu, PIT temperaturu (specifična za korištenu smjesu), i zatim brzo ohladi. Promjena temperature od niske do visoke dovodi do promjene strukture emulzije odnosno do fazne inverzije. Ta inverzija moguća je zbog različite topljivosti surfaktanta u uljnoj i vodenoj fazi ovisno o temperaturi. Nanoemulzije pripravljene PIT metodom ostaju stabilne tijekom znatnog vremenskog razdoblja zbog dobre pokrivenosti kapljica surfaktantima. Budući da je unos topline neophodan, PIT metoda može isključiti uporabu termolabilnih djelatnih tvari. Isto tako i međusobna kompatibilnost vode, ulja, surfaktanta i djelatne tvari je preduvjet za olakšavanje faznog prijelaza (Singh i sur., 2017).

1.3. Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija

Na konačna fizičko-kemijska svojstva pripravljene nanoemulzije utjecaj će imati i odabir brzine smicanja, izbor, koncentracija i redosljed dodavanja pomoćnih i djelatnih tvari te razlika u viskoznosti između vodene i uljne faze (Singh i sur., 2017). Ukoliko se primjeni veća brzina smicanja, zbog međupovršinske napetosti, dolazi do stvaranja manjih kapljica. Također, korištenjem ulja manje viskoznosti pri izradi nanoemulzija dolazi do stvaranja manjih kapljica (Singh i sur., 2017).

Veličina kapljica je jedna od najvažnijih fizičkih svojstava nanoemulzija. Metode određivanja veličine kapljica uključuju lasersku difrakciju i fotonsku korelacijsku spektroskopiju. U slučaju laserske difrakcije, kapljice prolaskom kroz izvor svjetlosti odnosno lasersku zraku raspršuju svjetlo pod kutom koji se logaritamski povećava sa smanjenjem veličine kapljica (Singh i sur., 2017). Kod fotonske korelacijske spektroskopije mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na kapljicama. Mjerenjem i preračunavanjem intenziteta raspršene svjetlosti uređaj izračunava veličinu kapljica. Rezultati se prikazuju kao prosječna veličina kapljica i indeks polidisperznosti. Indeks polidisperznosti predstavlja podatak o širini raspodjele veličine čestica, za nanoemulzije se smatra da su monodisperzne ako su im vrijednosti indeksa polidisperznosti niže od 0,2, dok vrijednosti bliže 1 ukazuju na polidisperzan sustav. Gustoća i viskoznost nanoemulzija također može imati utjecaja na ishod određivanja veličine kapljica, da bi se umanjio taj utjecaj prije mjerenja uzorci se često razrijeđuju u omjeru 1:100 ili 1:1000 (v/v) (Klang i Valenta, 2011).

Nanoemulzije su često transparentni pripravci, ali također mogu biti i mliječno bijelog izgleda (Gupta i sur., 2016). Veličina kapljica i njihova koncentracija su faktori koji nam određuju transparentnost, a oftalmički pripravci bi trebali biti što je moguće transparentniji da bi se mogla spriječiti zamagljenost vida nakon primjene oftalmičkog pripravka (Singh i sur., 2017).

Reološka svojstva nanoemulzija se mogu kontrolirati tako što je moguća promjena veličine kapljica, volumnog udjela unutarnje faze ili dodatkom tvari koje gelira (García-Celma i sur., 2016). Viskoznost nanoemulzija je obično vrlo niska, a može se odrediti uz pomoć viskozimetra ili reometra koji je prikladan za uzorke niske viskoznosti. Pokusima je dokazano da emulzije koje imaju uljnu fazu veće viskoznosti zahtjevaju veći tlak prilikom izrade

nanoemulzija za postizanje istih veličina kapljica kao i emulzije s uljnom fazom niže viskoznosti (Klang i Valenta, 2011).

1.4. Stabilnost nanoemulzija

Stabilnost se definira kao sposobnost sustava da zadrži svoja svojstva nepromijenjena ili minimalno promijenjena kroz određeni vremenski period ili pod utjecajem vanjskih faktora (García-Celma i sur., 2016). Nanoemulzije su kinetički stabilne i termodinamički nestabilne (slobodna energija nanoemulzije je veća od slobodne energije odvojenih faza), a destabilizacija nanoemulzija, što dovodi do odvajanja faza, uključuje flokulaciju, koalescenciju, Ostwaldovo zrenje, vrhnjenje i sedimentacija (Gupta i sur., 2016).

Nestabilnost nanoemulzija uglavnom je uzrokovana agregacijom kapljica zbog čega dolazi do povećanja kapljica čime se gube posebna svojstva nanoemulzija, ali također dolazi do ireverzibilnog odvajanja faza (Singh i sur., 2017). Prilikom flokulacije dolazi do priljepljivanja jedne kapljice za drugu zbog privlačnih sila, dok kod koalescencije dolazi do pucanja filma na granici faza i sve kapljice formiraju jednu veću kapljicu. Koalescencija je ireverzibilan proces dok je flokulacija reverzibilna (Gupta i sur., 2016).

Vrhnjenje i sedimentacija su rezultat različite gustoće faza, pri čemu kod vrhnjenja dolazi do izdvajanja većih kapljica prema površini nanoemulzije, a kod sedimentacije do taloženja na dnu nanoemulzije. Dovoljno mala veličina kapljica omogućuje otpornost prema vrhnjenju i sedimentaciji (García-Celma i sur., 2016).

Najčešći mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje, kod kojega veće kapljice rastu na račun malih kapljica. Manje kapljice imaju veći kemijski potencijal i time dolazi do prijenosa mase s manjih kapljica na veće. Moguće je prevenirati Ostwaldovo zrenje tako što se koristi ulje koje je slabo topljivo u vodi (Singh i sur., 2017).

Stabilnost nanoemulzija moguće je pratiti kroz procese zagrijavanja i hlađenja kako bi se vidjela otpornost nanoemulzija na moguće promijene temperature prilikom skladištenja lijeka. Dugotrajna ispitivanja stabilnosti uključuju pravilno skladištenje nanoemulzija u periodu od par mjeseci te se periodički provjeravaju izgled, veličina kapljica, disperznost, zeta-potencijal i slični parametri (Singh i sur., 2017).

1. 5. Primjena nanoemulzija u farmaciji

Nanoemulzije imaju veliki potencijal za učinkovitu dostavu lijekova različitim putovima primjene. Tijekom posljednjih deset godina istražuju se i razvijaju nanoemulzije za parenteralnu, oralnu, oftalmičku, dermalnu, transdermalnu, nazalnu i pulmonalnu primjenu (García-Celma i sur., 2016, Singh i sur., 2017, Rai i sur. 2018). Mogu se oblikovati u različite farmaceutske oblike odnosno tekuće oblike, kreme, gelove, aerosole i pjene. Istražuju se ponajviše kao terapijski sustavi za slabo topljive djelatne tvari (Lallemand i sur., 2012, Tamilvanan i Benita, 2004) te za djelatne tvari koje se temelje na nukleinskim kiselinama (Fraga i sur., 2008). Zbog nanometarske veličine kapljica odnosno velikog povećanja specifične površine, djelatnim tvarima uklopljenim u nanoemulzije se značajno poboljšava topljivost, ali i apsorpcija preko sluznica i kože što rezultira boljom bioraspoloživošću (Singh i sur. 2017, Rai i sur. 2018).

1.6. Komponente nanoemulzija

Glavne komponente nanoemulzija su vodena faza, ulja i surfaktanti (Singh i sur., 2017).

1.6.1. Ulja/lipidi

Ulje se uglavnom odabire na temelju topljivosti djelatne tvari u ulju i ovisno o biokompatibilnosti ulja. U slučaju izade U/V nanoemulzije uljne kapljice najčešće čine 2-20%, iako to može biti i puno veći udio. Najčešće korištena ulja su reesterificirane frakcije sojinog, sezamovog, kokosovog, rižinog i maslinovog ulja koja se označavaju kao dugolančani, srednjelančani i kratkolančani trigliceridi (Singh i sur., 2017).

1.6.2. Surfaktanti i kosurfaktanti

Surfaktanti su amfipatske molekule koje stabiliziraju nanoemulzije smanjujući međupovršinsku napetost između faza i sprječavajući agregaciju kapljica. Oni se nakupljaju na površini uljnih kapljica te ih stabiliziraju sterički, elektrostatski ili kombinacijom oba navedena učinka. Ionski surfaktanti pružaju elektrostatsku stabilizaciju, a neionski steričku. Izborom surfaktanta može se utjecati na veličinu kapljica, stabilnost nanoemulzija te farmakokinetiku uklopljene djelatne tvari (Singh i sur., 2017). Surfaktanti imaju hidrofilnu i hidrofobnu skupinu u svojoj strukturi, a hidrofilna skupina može biti bez naboja ili može nositi pozitivan ili negativan naboj ili kombinaciju pa razlikujemo neionske, kationske, anionske i amfoterne surfaktante (Klang i Valenta, 2011). Kao surfaktanti često se koriste lecitin, polisorbati iz skupine Tween, sorbitanski esteri iz skupine Span, Kolliphor EL,

natrijev deoksilat, poloksameri, natrijev dodecilsulfat, kopolimeri koji sadrže polietilenglikol i drugi (Singh i sur., 2017). Surfaktantima se mogu dodati i kosurfaktanti koji će dodatno stabilizirati površinu između faza, a najčešće korišteni su propanol, glicerol, etilenglikol, propilenglikol, etanol i drugi (Singh i sur., 2017).

1.6.3. Konzervansi, antioksidansi i ostali stabilizatori

Konzervansi koji se koriste u nanoemulzijama bi trebali biti niske toksičnosti te fizički i kemijski kompatibilni. Pošto mikroorganizmi mogu biti prisutni i u uljnoj i u vodenoj fazi, konzervansi bi trebao imati odgovarajuću koncentraciju u obje faze. Konzervansi se često izbjegavaju u parenteralnim pripravcima zbog svog toksičnog potencijala, a u oftalmičkim nanoemulzijama najčešće se koriste alkoholi poput klorbutanola i 2-fenoksietanola. Fenoli i kvarterni amonijevi spojevi se koriste kao konzervansi širokog spektra djelovanja, a kiseline i kiselinski derivati se koriste kao antifungalna sredstva (Singh i sur., 2017).

Ulja, lipidi kao i neke djelatne tvari u dodiru sa zrakom podložni su autooksidaciji, a da bi se spriječila oksidacija dodaju se antioksidansi koji mogu biti reducirajući agensi, poput askorbinske kiseline, natrijevog disulfata, natrijevog formaldehida, ili blokirajući agensi, poput estera askorbinske kiseline, tokoferola, ili sinergisti, poput askorbinske, limunske i vinske kiseline (Singh i sur., 2017).

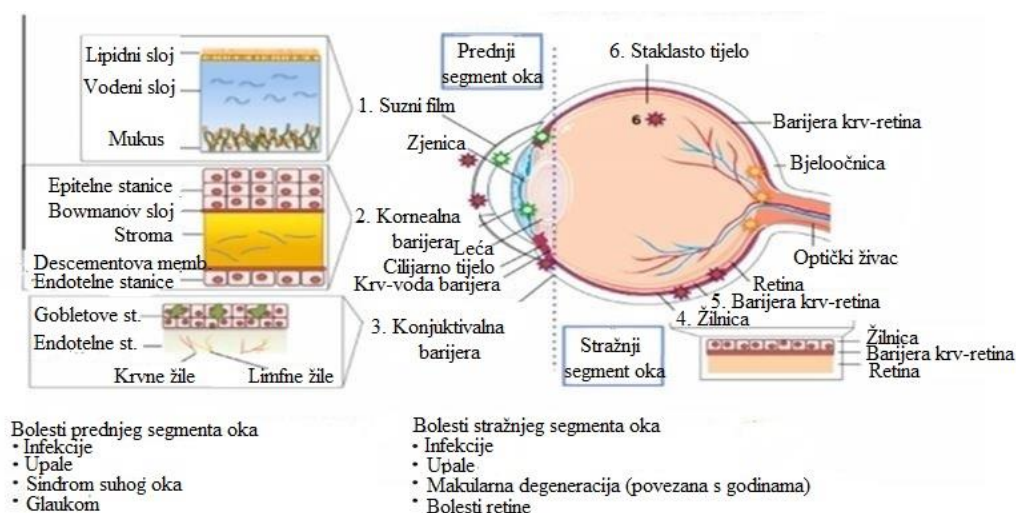
Nanoemulzije su uglavnom transparentne, pa je ponekad potreban dodatak kelirajućih agenasa, pH stabilizatora ili UV protektanata da bi se spriječio vidljivo i UV zračenje da prodiere kroz sustav i katalizira fotodegradaciju djelatne tvari (Singh i sur., 2017).

1.7. Topikalna oftalmička primijena

Bolesti oka najčešće se liječe topikalnom primjenom kapi za oko. Kapi za oko u obliku otopine koriste se za primjenu djelatnih tvari dobro topljivih u vodi, dok se slabo topljive djelatne tvari primjenjuju u obliku suspenzije. Međutim, bioraspoloživost lijeka u oku nakon primjene konvencionalnih otopina i suspenzija na površinu oka je vrlo mala zbog fizioloških (nazolakrimalna drenaža, suzenje, treptanje) i anatomskih (rožnica) barijera prednjeg segmenta oka. Zbog suzenja, treptanja i nazolakrimalne drenaže zadržavanje djelatne tvari na površini oka ograničeno je na svega nekoliko minuta (Pepić i sur. 2014.). Istražuju se farmaceutsko-tehnološka rješenja koja bi omogućila produljeno zadržavanje formulacije odnosno djelatne tvari na površini oka.

1.7.1. Barijere prednjeg segmenta oka

Nakon topikalne oftalmičke primjene, većina terapijski značajnih djelatnih tvari (uglavnom male lipofilne molekule) apsorbira se u oko preko rožnice (Pepić i sur., 2012.). Rožnicu vlaži i štiti preokularni suzni film koji se sastoji od dva sloja: (i) vodenomukoznog sloja gela koji čini glavninu debljine suznog filma i u izravnom je kontaktu s epitelom rožnice, i (ii) vrlo tanki lipidni sloj koji je barem djelomično integriran s vodenomukoznim gelom. Vodenomukozni sloj sadrži mucine, glikoproteine velike molekulske mase s polisaharidnim postraničnim lancima na čijim se završecima najčešće nalazi fukoza ili sijalinska kiselina (N-acetilneuraminska kiselina, $pK_a = 2,6$), zbog čega su negativno nabijeni pri fiziološkom pH. Također se u tom sloju nalaze otopljene soli te drugi proteini kao što su albumin, lizozim, laktoferin i imunoglobulin G (Reimondez-Troitiño i sur., 2015). Mucini formiraju sloj hidrofilnog gela koji predstavlja barijeru difuziji djelatne tvari (Gan i sur., 2013). Neuronski sustav rožnice detektira promjene pH i osmolarnosti i time može izazvati refleksno treptanje i suzenje koji pridonose bržem uklanjanju formulacije/djelatne tvari s površine oka (Lallemant i sur., 2012). Apsorpcija djelatne tvari preko rožnice ograničena je vanjskim lipofilnim epitelom te središnjom hidrofilnom stromom dok unutrašnji lipofilni endotel rožnice ne predstavlja značajnu barijeru. Epitel rožnice sastoji se od 5-6 slojeva stanica pri čemu je površinski sloj stanica povezan čvrstim vezama (engl. *tight junction*). Ostali slojevi rožnice su Bowmanova membrana, stroma, Descemetova membrana i endotela, a svaki je naizmjeničnih polariteta (lipofilan/hidrofilan). Takva struktura čini rožnicu ključnom barijerom apsorpciji djelatnih tvari. Najučinkovitija apsorpcija preko rožnice postižu djelatne tvari koje karakterizira koeficijent raspodjele ($\log D$) u rasponu od 2 do 3.

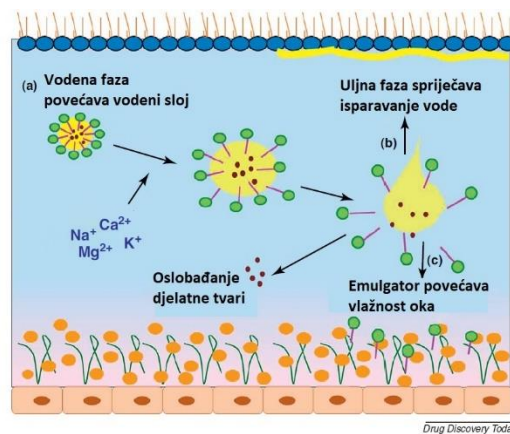


Slika 2. Građa oka (Reimondez-Troitiño i sur., 2015).

1.7.2. Nanoemulzije u oftalmičkoj primjeni lijekova

Nanoemulzije predstavljaju jedno od mogućih farmaceutsko-tehnoloških rješenja koje osiguravaju povećanje topljivosti slabo topljivih djelatnih tvari i produljeno zadržavanje na površini oka.

Nanoemulzije za oftalmičku primjenu lijekova pokazale su sposobnost a) uklapanja djelatnih tvari različitih svojstava uključujući i velike biomakromolekule, b) zaštite osjetljivih djelatnih tvari tijekom skladištenja i primjene, c) produljenog zadržavanja uklopljene djelatne tvari na površini oka, d) poboljšanja interakcije uklopljenih djelatnih tvari s epitelom rožnice i spojnice te posljedično povećanje bioraspoloživosti, e) smanjenja učestalosti nuspojava u usporedbi s primjenom konvencionalnih oblika (otopina i suspenzija) (Gan i sur., 2013, Reimondez-Troitiño i sur., 2015). Prema dosadašnjem shvaćanju nanoemulzije se u doticaju s površinom oka ponašaju poput suznog filma (Slika 3). Nanoemulzije se destabiliziraju pri miješanju sa suznim filmom; uljne kapljice se udružuju i stapaju s lipidnim slojem suznog filma, dok se surfaktanti vežu za vodenomukozni sloj (Walenga i sur., 2019, Gan i sur., 2013). Interakcija s lipidnim slojem suznog filma, koji se zadržava dulje vrijeme u konjunktivalnoj vrećici, pruža mogućnost da uljna faza u kojoj se nalazi uklopljena djelatna tvar se zadrži dulje na površini oka i djeluje kao skladište djelatne tvari (Reimondez-Troitiño i sur. , 2015).



Slika 3. Interakcija U/V nanoemulzije i suznog filma: a) nakon primjene vodena faza emulzije povećava volumen vodenomukoznog sloja suznog filma, b) uljne kapljice stapaju se s lipidnim slojem suznog filma pri čemu nastaje skladište djelatne tvari koja se produljeno zadržava na površini oka c) surfaktatni povećavaju debljinu vodenomukoznog sloja i poboljšavaju sposobnost močenja suznog filma (Gan i sur., 2013).

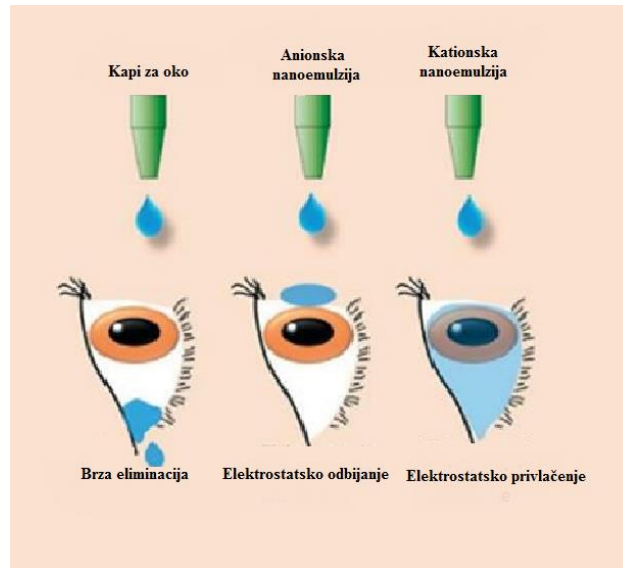
Nanoemulzije su pokazale veliki potencijal u liječenju bolesti suhog oka baš zbog sličnosti s suznim filmom, a čija homeostaza je narušena u bolesti suhog oka (Lallemand i sur., 2017). Pokazale su se kao izvrsna strategija poboljšanja bioraspodjelivosti u oku ne-glukokortikoidnog imunomodulatora ciklosporina A (CsA) nakon topikalne oftalmičke primjene. Na tržištu su trenutno oftalmički lijekovi Restasis® (Allergan), anionska U/V nanoemulzija s CsA bez konzervansa i s ricinusovim uljem emulgiranim i stabiliziranim pomoću polisorbata 80 i kopolimera karbomera, a koju je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (FDA), te Lacrinmune® (Bausch & Lomb, odobren u Argentini), sličnog sastava onome Restasis®, osim dodatka natrijevog hijaluronata koji povećava viskoznost formulacije s ciljem dodatnog produljenja zadržavanja formulacije na površini oka. Pri primjeni lijeka Restasis® zabilježeno je produljeno zadržavanje formulacije na površini oka (3 do 4 sata nakon primjene, dok je za kapi za oko u obliku otopine vrijeme zadržavanja svega nekoliko minuta) (Stevenson i sur., 2000).

1.8. Kationske nanoemulzije u oftalmičkoj primjeni

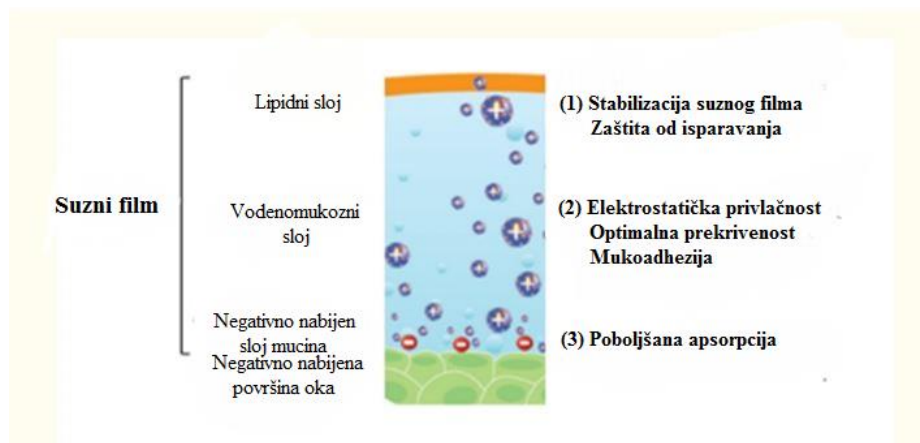
Vrijeme zadržavanja formulacije na površini oka može se dodatno produljiti korištenjem kationskih surfaktanata ili polimera koji ulaze u interakciju s mucinima iz vodenomukoznog sloja suznog filma. Kationske nanoemulzije kod kojih su kationski surfaktantni ili polimeri nositelji pozitivnog naboja na površini kapljica ostvaruju elektrostatske interakcije s negativno nabijenim mucinima na površini oka. Pozitivno nabijene kapljice ulja nanometarske veličine stvaraju veliku kontaktnu površinu s negativno nabijenom površinom oka i tako omogućuju produljeno zadržavanje te poboljšanu apsorpciju uklopljene djelatne tvari (Lallemand i sur., 2012). Pozitivni naboj omogućuje i bolje širenje formulacije po površini oka pri samoj primjeni kapi za oko (Slika 4).

Na tržištu Europske unije nalazi se lijek Ikervis® (Santen), kationska nanoemulzija triglicerida srednje duljine lanca emulgiranih i stabiliziranih pomoću Tyloxapola, Poloksamera 188 i cetalkonijevog klorida u koju je uklopljen CsA. Ikervis® se temelji na Novasorb® tehnologiji pri čemu kvarterni amonijev cetalkonijev klorid, alkilni derivat benzalkonijevog klorida, nema ulogu konzervansa u formulaciji već osigurava pozitivan naboj na površini uljnih kapljica nanometarskih dimenzija. Stoga se pretpostavlja da je vrijeme zadržavanja CsA uklopljenog u Ikervis® veće od vremena zadržavanja CsA uklopljenog u Restasis® , čime je moguće, uzimajući u obzir i veću dozu CsA, objasniti

razliku u režimu doziranja između jedanput dnevno Ikervisa® nasuprot dva puta na dan Restasisa® (Lallemand i sur., 2017).



Slika 4. Ponašanje kapi na površini oka (Gan i sur., 2013).



Slika 5. Kationska nanoemulzija koja stupa u interakciju s negativno nabijenim mucinima u vodenomukoznom sloju suznog filma te glikokaliksom epitelnih stanica rožnice (Lallemand i sur., 2012).

1.8.1. Kationski surfaktanti i polimeri kao nositelji pozitivnog naboja

Osim cetalkonijevog klorida kao kationski surfaktanti u razvoju oftalmičkih nanoemulzija istražuju se heksadecil trimetil amonij bromid (CTAB), 1,2-dioleil-3-trimetilamonijpropan (DOTAP), stearilamin (SA) i drugi (Lallemand i sur., 2012). Također, veliki potencijal ima i kationski polimer kitozan (Fuente i sur., 2010).

Površinski naboj kapljica nanoemulzije definiran je zeta-potencijalom. Zeta-potencijal odgovara električnom potencijalu koji okružuje uljnu kapljicu u ravnini hidrodinamičkog smicanja. Ovisi o prirodi kationskog agensa, o njegovoj koncentraciji i okolini elektrolita uljne kapljice. Osim povećanja vremena zadržavanja na negativno nabijenoj površini oka, pozitivni naboj kapljica ključan je za postizanje ključnih fizičko-kemijskih svojstava kao što su stabilnost, širenje formulacije na površini oka te biokompatibilnost s površinom oka. Stoga je potrebno pažljivo odabrati kationski surfaktant tijekom razvoja formulacije, budući da uspjeh formulacije u velikoj mjeri ovisi o izboru kationskog surfaktanta.

Pozitivni naboj pridonosi stabilizaciji nanoemulzije zbog elektrostatskog odbijanja pozitivno nabijenih uljnih kapljica nanoemulzije. Pokazano je ukoliko je zeta-potencijal manji od +10 mV, nanoemulzije se ne mogu autoklavirati bez destabilizacije uljnih kapljica. Pokazalo se da je optimalni raspon zeta-potencijala između +20 mV i + 40 mV. U usporedbi s anionskim i neionskim površinski aktivnim tvarima, poznato je da su kationski surfaktanti najtoksičniji surfaktanti. Stoga je izazov pripremiti kationsku emulziju sa zeta-potencijalom dovoljno visokim da stabilizira nanoemulziju, ali sa što nižom koncentracijom kationskog surfaktanta kako bi se osigurala sigurnost primjene oftalmičke nanoemulzije.

Stearilamin je jedan od često korištenih kationskih lipida u razvoju kationskih liposoma ili kationskih nanoemulzija (Lallemant i sur., 2012). Stearilamin je ravnolančani primarni amin sa zasićenim lancem od 18 ugljikovih atoma (oktadecilamin). Pokazana je dobra podnošljivost topikalnih oftalmičkih formulacija sa stearilaminom pri višekratnoj primjeni u kunića (Klang i sur., 1994).

1.9. Ispitivanje biokompatibilnosti oftalmičkih formulacija tijekom razvoja lijeka

Ključan aspekt razvoja oftalmičke formulacije je ispitivanje biokompatibilnosti formulacije. Kationski surfaktanti mogu se nespecifično vezati za staničnu membranu epitelnih stanica rožnice uzrokujući njezinu povećanu propusnost, što je povezano s povećanjem permeabilnosti rožnice, ali i toksičnim učinkom ovisnim o koncentraciji kationskog surfaktanta. Za ispitivanje biokompatibilnosti danas se koriste brojne alternativne *ex vivo* i *in vitro* metode, zbog smanjena broja ispitivanja na laboratorijskim životinjama poput Draize testa (Wilson i sur., 2014).

Draize test je naziv za ispitivanje iritacije oka na oku kunića, pri čemu se na jedno oko primjeni ispitivani uzorak, a drugo oko služi kao slijepa proba. Originalni Draize test zahtjeva minimalno šest kunića po pokusu, ali taj broj se može smanjiti na tri ili jednog kunića ukoliko

se očekuje ozbiljno oštećenje oka. Uzorak se primjenjuje jednokratno, u slučaju ispitivanja akutne iritacije, ili višekratno, kroz duži vremenski period ukoliko se ispituje kronična iritacija oka. U određenim se vremenskim intervalima nakon primjene ispitivanog uzorka bilježe se klinički znakovi iritacije i boduju u skladu sa skalom Draize testa. Zbrajanjem iritacijskih bodova opaženih za svakog kunića i dijeljenjem s ukupnim brojem kunića izračuna se ukupna iritacija koju uzrokuje ispitivani uzorak. Stupnjevi iritacije su: ne iritira, blago iritira, umjereno iritira i jako iritira (Wilson i sur., 2014).

Ex vivo modeli u usporedbi s *in vitro* modelima, imaju manji kapacitet, ali veću predvidljivost. Manje su osjetljivi na toksične učinke visokih koncentracija pomoćnih tvari zbog veće složenosti tkiva. Zbog ograničene dostupnosti ljudskih rožnica, koje su uglavnom koriste u svrhu transplantacije, rožnice životinjskog podrijetla uglavnom se koriste za ispitivanje permeabilnosti. Najčešće se koriste rožnica kunića, svinja i goveda. Uporaba rožnice kunića u *ex vivo* studijama može olakšati uspostavljanje korelacija *ex vivo-in vivo*, jer se kunići najčešće koriste za proučavanje bioraspodivnosti lijeka *in vivo*. Međutim, permeabilnost rožnice kunića je veća u usporedbi s ljudskom rožnicom, zbog specifičnih strukturnih razlika, kao što su nedostatak Bowmanovog sloja i manja debljina rožnice. Do danas rožnica kunića se ne smatra adekvatno validiranim modelom za ispitivanje i klasifikaciju iritacije oka. Svinjske oči predstavljaju alternativni izvor životinjskih rožnica, a pokazalo se da je svinjska rožnica strukturno najsljednija ljudskoj rožnici. Prednost tog modela je njegova ekonomičnost i etička prihvatljivost jer je riječ o otpadnom produktu prehrambene industrije (Wilson i sur., 2014.).

In vitro modeli – većina *in vitro* modela koji se koriste u ispitivanju okularne toksičnosti/podnošljivosti sastoji se od monosloja kultiviranih stanica (dvodimenzionalni (2D) stanični modeli). Najokarakteriziranija stanična linija humanog porijekla koja se koristi za ispitivanje biokompatibilnosti s rožnicom te za ispitivanje transkornealne permeabilnosti je imortalizirana humana stanična linija epitelnih stanica rožnice (HCE-T) (Juretic i sur., 2017). Međutim, 2D modeli ne odražavaju stvarnu trodimenzionalnu (3D) strukturu epitela rožnice. Korištenje neprikladnih eksperimentalnih alata može dovesti do pogrešnih zaključaka o biokompatibilnosti formulacije. Stoga se razvijaju epitelni modeli iz životinjskih epitelnih stanica rožnice, ljudskih epidermalnih stanica ili ljudskih kornealnih stanica, koje se obično uzgajaju u definiranom mediju na membranskim umetcima na kojima dolazi do stvaranja višeslojnog (3D) epitela.

3D *in vitro* modeli rožnice temelje se na primarnim kulturama stanica ili imortaliziranim staničnim linijama. Primarne stanice se izoliraju iz tkiva bilo migracijom stanica iz fragmenata tkiva u kulturi ili mehaničkom/enzimatskom obradom tkiva. Broj staničnih dioba stanica primarne kulture ograničen je zbog procesa starenja koji na kraju dovodi do stanične smrti. Imortalizirane stanične linije su izvedene iz tumorskih stanica ili se mogu proizvesti iz primarnih stanica spontanom transformacijom u kulturi. Za razliku od primarnih stanica, imortalizirane stanične linije imaju gotovo beskonačni kapacitet replikacije i mogu se pohraniti u tekućem dušiku kroz duže vrijeme i odmrznuti prema potrebi, što ih čini prikladnijim za rutinsku upotrebu *in vitro* modela rožnice (Wilson i sur., 2014). HCE-T stanice koriste se i u razvoju 3D modela rožnice, od jednostavnijih samo epitelnih modela rožnice do složenog modela koji je ekvivalent ljudske rožnice (hemikornea). Hemikornea dobivena je ko-kultiviranjem HCE-T stanica sa stromalnim stanicama čime strukturu tog modela čine epitel i stroma rožnice (Juretić i sur., 2017.)

In vitro model rožnice koristi se za provođenje različitih testova citotoksičnosti koji su brzi, jednostavni i jeftini, uključujući ispitivanje učinka na staničnu proliferaciju (ugradnja obilježenog timidina ili bromodeoksiuridina), određivanje koncentracije proteina različitim kolorimetrijskim testovima (npr. uz pomoć Coomassie modrila ili Loweyevog reagensa), određivanjem metaboličke aktivnosti stanica (primjerice MTT test), određivanje integriteta stanične membrane (primjerice LDH test, bojenje propidij jodidom) i dr. Svaka od ovih metoda ima svoje prednosti i ograničenja. Općenito, kombinacija dviju ili više metoda uobičajeno se koristi za procjenu citotoksičnosti. Testovi koji koriste boje kao što je propidij jodid temelje se na konceptu da će boje biti spriječene ući u stanicu osim ako ne postoji poremećaj/oštećenje stanične membrane. Stoga zdrave stanice ostaju nebojene, dok će mrtve stanice biti obojene (pozitivna reakcija). DNA se može kvantificirati korištenjem testa ugradnje označenih nukleozida, 3H-timidin (radioaktivni nukleozid), ili 5-bromo-2'-deoksiuridina (BrdU) koji se inkorporiraju u novosintetiziranu DNA tijekom mitoze. Prednost ovih testova ugradnje je u tome što su oni izravna mjere proliferacije stanica. Za određivanje citotoksičnosti mogu se koristiti testovi određivanja koncentracije proteina unutar stanica. Smanjenje koncentracije proteina odgovaralo bi smanjenju broja stanica. Proteinski test koji koristi Coomassie modrilo kao reagens je kolorimetrijski proteinski test koji se može koristiti za kvantifikaciju staničnih proteina mjerenjem apsorbancije. Slično tome, Lowry test mjeri intenzitet promjenjene boje reakcijom bakrovih iona s aminokiselinama u proteinima u alkalnim uvjetima. Enzimatski testovi su među najčešće korištenim za procjenu

citotoksičnost. Laktat dehidraza (LDH) test kvantificira količinu oslobođenog LDH iz stanica zbog oštećenja stanične membrane, te koriste oslobođeni LDH za katalizu laktata do piruvata koji se može mjeriti kolorimetrijski i koristiti za kvantificiranje broja mrtvih stanica (Wilson i sur., 2014). MTT test mjeri aktivnost mitohondrijskog enzima sukcinil-dehidrogenaze (Pauly, 2009). Stanične sukcinil-dehidrogenaze reduciraju žuto obojeni MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazol bromid) u ljubičasto obojeni produkt formazan. Nastali spoj netopljiv je u vodi, ali je topljiv u organskom otapalu kao što je izopropanol. Mjeri se apsorbancija izopropanolne otopine formazana pri 570 nm, koja je proporcionalna broju metabolički aktivnih stanica (Pauly, 2009).

1.10. Mukoadhezija

Mukoadhezivne formulacije zbog interakcije s mucinima prisutnim na sluznicama imaju sposobnost duljeg zadržavanja na mjestu primjene/apsorpcije lijeka, a posljedica toga je povećana bioraspoloživost lijeka. Mukoadhezivni terapijski sustavi temelje se na mukoadhezivnim molekulama, primjerice surfaktantima i polimerima koji mogu stupiti u interakciju s mucinima. Interakcija s mucinima (mukoadhezija) temelji se na vodikovim vezama, elektrostatskim interakcijama ili ispreplitanju polimernih lanaca sa slojem mucina (Subrizi i sur., 2019, Ruponen i Urtti, 2015). U mukoadhezivne polimere ubrajaju se primjerice hijaluronska kiselina, karbomer, polietilenglikol, polivinilpirolidon, polivinilalkohol i kitozan. Reološka analiza često je korišten pristup za ispitivanje mukoadhezivnog potencijala raznih formulacija. U tu se svrhu mogu mjeriti viskoznost i/ili viskoelastična svojstva (Rossi i sur., 2018). Jednostavan postupak za procjenu apsolutne sile bioadhezije uključuje praćenje promjena viskoznosti u sustavu mucina izoliranog iz želudca svinje i odabranih polimera u otopini. Za izračun viskoznosti koja se dogodila uslijed mukoadhezije koristi se slijedeća jednadžba:

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_p$$

pri čemu je η_b - komponenta viskoznosti nastala uslijed bioadhezije

η_t - viskoznost cijelog sustava

η_m i η_p – su individualne komponente viskoznosti mucina i bioadhezivnog polimera (Hassan i Gallo, 1990.).

Reološko mjerenje viskoelastičnih svojstava zbog svojeg bi nedestruktivnog karaktera trebalo pružiti dublji uvid u strukturu nastale mukoadhezivne međupovršine. U viskoelastičnim reološkim ispitivanjima otopina/disperzija mucina pomiješana s otopinom polimera, čista otopina mucina i čista otopina polimera su podvrgnute deformaciji izabranom unutar linearnog viskoelastičnog područja uz promjenu frekvencije te bilježi G' (elastični modul pohrane) i G'' (viskozni modul gubitka) profili kao funkcija frekvencije. Vrijednosti (dobivene pri srednjoj vrijednosti frekvencije ili kao srednje vrijednosti onih izmjerenih unutar cijelog raspona frekvencija) G' i G'' koriste se za izračun parametara $\Delta G'$ i $\Delta G''$. Takvi se diferencijalni parametri računaju kao razlika vrijednosti izmjerene za smjesu otopine polimera i mucina i teorijske vrijednosti izračunate kao zbroj pojedinačno izmjerenih vrijednosti za otopinu polimera i otopinu/disperziju mucina. Vrijednosti $\Delta G'$ i $\Delta G''$ veće od 0 upućuju na nastanak mukoadhezivnih veza (Rossi i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pri razvoju kationskih nanoemulzija najbitniji je odabir vrste i koncentracije nositelja pozitivnog naboja kako bi se osigurao dovoljan pozitivni naboj za uspješnu interakciju kapljica s površinom oka (radi duljeg zadržavanja na površini oka), a izbjegao potencijalni toksični učinak. U ovom diplomskom radu korišten je stearylamin kao nositelj pozitivnog naboja prilikom izrade U/V nanoemulzija kod kojih se kao uljna faza koristio Miglyol 812 kao polusintetsko ulje, Kolliphor EL kao neionoski surfaktant te pročišćena voda.

Specifični ciljevi diplomskog rada bili su:

- pripremiti nanomeulzije visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije;
- odrediti fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal;
- ispitati stabilnost pripremljenih nanoemulzija;
- ispitati biokompatibilnost pripremljenih nanoemulzija korištenjem 3D modela epitela rožnice;
- ispitati mukoadhezivnost pripremljenih nanoemulzija reološkom metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi nanoemulzija korišteni su Miglyol 812 (Myritol 318, Kemig, Hrvatska) – trigliceridi srednje duljine lanca, Kolliphor EL (BASF, Njemačka) - glavna komponenta je glicerol polietilenglikol ricinoleat, stearilamin (Octadecylamin, Sigma-Aldrich, SAD) i pročišćena voda. Kod mjerenja veličine kapljica korištena je pročišćena voda, dok je kod mjerenja zeta-potencijala korištena 10 mM otopina NaCl (Kemig).

Za uzgoj stanica korišten je hranidbeni medij Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/ F-12) (Lonza, Švicarska) u koji je dodan dimetilsulfoksid (DMSO, 0,5% (*v/v*), AppliChem GmbH, Njemačka), fetalni goveđi serum (FBS, 5% (*v/v*), Biosera, Francuska), otopina humanog inzulina (5 µg/mL, Sigma-Aldrich), epidermalni faktor rasta (10 ng/mL, Sigma-Aldrich), te otopina antibiotika i antimikotika za stanične kulture (10% (*v/v*), penicilin/streptomycin/amfotericin B, kat.br.17-745E, Lonza). Korišten je HBSS pufer (Hank's Balanced Salt Solution) koji je izrađen otapanjem 0,0463 g CaCl₂×2 H₂O (Kemig), 0,0250 g MgCl₂×6H₂O (Kemig), 0,0250 g MgSO₄×7H₂O (Kemig), 0,1 g KCl (Kemig), 0,015 g KH₂PO₄ (Kemig), 0,0875 g NaHCO₃ (Kemig), 2 g NaCl (Kemig), 0,015 g Na₂HPO₄×2H₂O (Kemig), 0,275 g D-Glukoza monohidrata (Kemig) i 1,7875 g HEPES-a (Kemig) u 250 mL pročišćene vode. pH vrijednost pufera podešena je na 7,4 korištenjem 1 M otopine NaOH (T.T.T., Hrvatska).

Za presađivanje stanica korišteni su: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) bez kalcija i magnezija (Sigma- Aldrich), tripsin-EDTA (170 000 U/L Trypsin, 200 mg/L EDTA, Lonza) i tripsin 0,25% (*v/v*) (Lonza).

Za oblaganje Transwell[®] ploče korišteni su kolagen izoliran iz repa štakora tip 1 (Sigma-Aldrich) i 0,1% (*v/v*) otopina humanog fibronektina (Sigma- Aldrich).

Za uzgoj staničnog modela epitela humane rožnice korištena je Transwell[®] ploča s 12 jažica i polikarbonatnom membranom veličine pora 0,4 µm (kat.br. 3401, Corning Inc., SAD).

Za reološka mjerenja korišteni su mucin tip II izoliran iz želudca svinje (Sigma-Aldrich) i simulirana suzna tekućina (STF, engl. *Simulated Tear Fluid*) čiji sastojci su: 1,4 g KCl (Kemig), 6,8g NaCl (Kemig), 2,2g NaHCO₃(Kemig), 0,084g CaCl₂ x 2 H₂O (Kemig) i pročišćena voda do 1000 mL.

3.2. Metode

3.2.1. Izrada nanoemulzija sa stearylaminom

Prilikom izrade nanoemulzija korišteni su Miglyol 812 kao polusintetsko ulje, Kolliphor EL kao neionoski surfaktant, stearylamin kao nositelj pozitivnog naboja te pročišćena voda. Sastav ispitivanih formulacija naveden je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav izrađenih nanoemulzija.

Formulacije	F1 0% SA	F2 0,01%SA	F3 0,05%SA	F4 0.1%SA	F5 0,3%SA
Miglyol 812 (g)	15	15	15	15	15
Kolliphor EL (g)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Stearilamin (SA) (g)	0	0,03	0,15	0,3	0,9
Voda (g)	277,5	277,5	277,4	277,2	276,6

Svaka nanoemulzija je napravljena u duplikatu. Prvo je odvagano stearylamin, kojem je potom dodan Miglyol 812 koji su zajedno činili uljnu fazu. Zasebno je izrađena vodena faza koja se sastojala od pročišćene vode i surfaktanta Kolliphor EL. Grube emulzije su izrađene tako da su prvo odvojeno zagrijane vodena i uljna faza na 50 - 60 °C, a zatim je vodena faza dodana u uljnu fazu uz miješanje na magnetskom mješaču te su potom dobivene emulzije obrađene koristeći Ultra-Turrax dispergirajući uređaj (Ultra-Turrax T45, Janke & Kunkel Kg., Njemačka) u trajanju od 5 minuta pri 6000 rpm (engl. *revolutions per minute*). Tako dobivene grube emulzije obrađene su koristeći mikrofluidizator (Model M-110EH-30 Microfluidizer, Microfluidics, Newton MA, SAD) kroz 10 ciklusa pri tlaku od 1000 bara. Izrađene nanoemulzije skladištene su u zatvorenim staklenim bočicama u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C.

3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Nanoemulzije su prije mjerenja veličine kapljica i indeksa polidisperznosti razrijeđene pročišćenom vodom 100 puta. Mjerenja su provedena na uređaju Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Malvern, UK) u jednokratnim polistirenskim kivetama. Uređaj radi na principu fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *Photon Correlation Spectroscopy*, PCS).

Kapljice uljne faze su konstantno u gibanju unutar nanoemulzije zvanom Brownovim gibanjem. Obasjavanjem kapljica He-Ne laserom uređaja dolazi do raspršenja svjetlosti različitim intenzitetom i pod različitim kutovima zbog Brownovog gibanja i različite veličine kapljica, a raspršene zrake svjetlosti se mjere pod kutom od 175°. Mjerenjem i preračunavanjem intenziteta raspršene svjetlosti uređaj izračunava veličinu kapljica. Rezultati se prikazuju kao prosječna veličina kapljica (engl. *Z-Average*,) i indeks polidisperznosti (engl. *Polydispersity index*, PDI) (O'Neal i sur., 1998). PDI je mjera raspodjele veličine kapljica koja govori o homogenosti disperzije, a kreće se između vrijednosti 0 i 1, gdje 0 predstavlja monodisperzni sustav, a njegovim povećanjem i približavanjem vrijednosti 1 smanjuje se homogenost sustava.

3.2.3. Mjerenje zeta-potencijala

Prilikom mjerenja zeta-potencijala nanoemulzije su razrijeđene 100 puta s 10 mM otopinom NaCl. Za mjerenje zeta-potencijala korišten je uređaj Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Malvern, UK) koji mjeri na principu fotonske korelacijske spektroskopije. Vrijednosti zeta-potencijala dobiju se mjerenjem elektroforetske pokretljivosti kapljica, koja označava konstantnu brzinu nakon uspostave ravnoteža između dvaju sila - primjenom električnog polja nabijene čestice putuju prema suprotno nabijenoj elektrodi i time stvaraju jednu silu, a njima nasuprot djeluje sila viskoznosti. Ta brzina, zvana elektroforetska pokretljivost, ovisi o jakosti električnog polja, dielektričnoj konstanti, viskoznosti disperznog sredstva i zeta-potencijalu (Zetasizer 2000/3000: Priručnik za uporabu, 2000). S obzirom na to da se nabijene čestice nalaze u promjenjivom električnom polju, one se gibaju i raspršuju svjetlost. Ovisno o brzini gibanja mijenja se i frekvencija svjetlosti. Elektroforetska pokretljivost izračunava se iz spektra frekvencija koje proizlaze iz detektiranih fotona svjetlosti. Iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti kapljica u električnom polju zeta-potencijal se izračuna pomoću Smoluchowskijeve jednadžbe:

$$U_E = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

gdje je ζ - zeta-potencijal, U_E - elektroforetska pokretljivost, η viskoznost disperznog sredstva, a ε dielektrična konstanta disperznog sredstva.

3.2.4. Mjerenje pH nanoemulzija

Za mjerenje pH vrijednosti korišten je uređaj Seven Multi pH/konduktometar (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD). Prije samog mjerenja pH vrijednosti nanoemulzija potrebno je

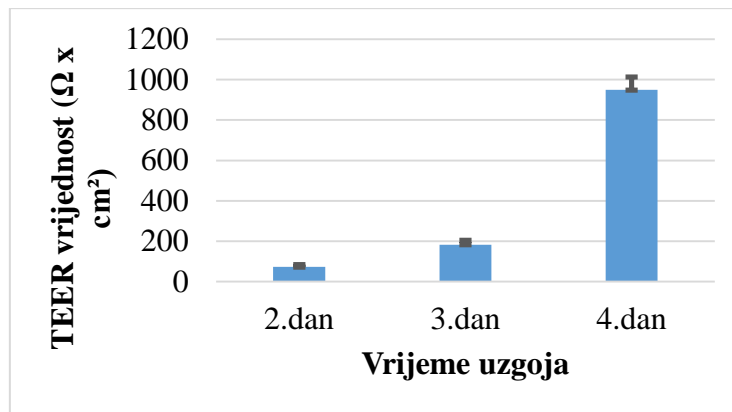
kalibrirati pH metar, a to se radi pomoću 3 otopine pufera različitih pH vrijednosti. Pufferi za kalibraciju imaju pH vrijednost iznad i ispod očekivanog pH mjerenih uzoraka. Nakon kalibracije pH elektroda se ispere s destiliranom vodom te se nakon toga izmjeri pH vrijednost nanoemulzija.

3.2.5. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

Nanoemulzijama je ispitana stabilnost tako da su nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C ponovno izmjereni: veličina kapljica, indeks polidisperznosti, zeta-potencijal i pH.

3.2.6. Metoda i uvjeti izrade *in vitro* modela epitela rožnice

Korištena je stanična linija humanih epitelnih stanica rožnice HCE-T (RIKEN Cell bank, Japan). Imortalizirane stanice uzgajaju se u tikvicama za uzgoj stanica u inkubatoru pri temperaturi 37°C, relativnoj vlažnosti zraka od 95% , u atmosferi s 5% CO₂. Stanice rastu u hranidbenom mediju DMEM/F-12 (Lonza, Švicarska) koji je pripremljen na način opisan u odjeljku 3.1. Svaka dva dana stanicama se mijenja medij, a kad se postigne konfluentnost stanica, potrebno je stanice presaditi i osigurati im novu površinu za rast. To se čini tako da se najprije ukloni medij u kojem su stanice rasle, a potom se površina sa stanicama polagano ispire dodatkom PBS-a. Odvajanje stanica od površine na kojoj su uzgajane vrši se enzimski, koristeći enzim tripsin. Pregledom na mikroskopu utvrđuje se da stanice poprimaju sferični oblik te plutaju u mediju, što potvrđuje da su se stanice odvojile s podloge i zatim se dodatkom medija koji sadrži serum inhibira aktivnost tripsina. Sadržaj tikvice se centrifugira tijekom 3 minute pri brzini okretaja 800 x g (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, Njemačka). Supernatant se pipetira i odbacuje, a dodaje se svježi medij te se nježnim pokretima homogenizira suspenzija stanica. Broj stanica po mL određuje se brojanjem na hemocitometru. HCE-T stanice (100 000 stanica po jažici) se nasaduju na polikarbonatnu membranu (Transwell[®], veličine pora 0,4 µm; Corning Inc., SAD) koja je prethodno obložena kolagenom i fibronektinom tako da se na membranu nanese prethodno izrađena otopina kolagena (1,5 mg/mL) po 150 µL u svaku jažicu te se ona inkubira tijekom 5 sati na 37 °C, nakon čega se otopina ukloni, a zatim se dodaje po 400 µL otopine fibronektina (10 µg/mL) koja se inkubira tijekom 20 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije otopina se uklanja te je ploča spremna za nasadivanje. Stanice se uzgajaju u hranidbenom mediju i mjeri se otpor do naglog porasta vrijednosti transepitelnog električnog otpora (engl. *Trans epithelial Electrical Resistance*, TEER) nakon čega se sve jažice izlažu zraku tijekom tri dana radi poticanja diferencijacije i stvaranja višeslojnog epitela. Kretanje TEER vrijednosti modela tijekom 4 dana uzgoja u mediju, do trenutka izlaganja zraku prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Ovisnost TEER vrijednosti staničnog modela humanog epitela rožnice o vremenu uzgoja. Otpor je izmjereno na dan 2, 3 i 4. Na dan 4 je otpor bio dovoljno visok pa je stanični model bio izložen zraku. TEER vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=15).

Kako bi se procijenila barijerna svojstva modela epitela rožnice mjeri se TEER vrijednost. Svako jažici u različitim fazama uzgoja, mjereno je otpor elektrodom (STX-2, WPI, SAD) tri puta, a vrijednost je očitana na voltmetru (EVOM, WPI, SAD). Srednjoj vrijednosti tri mjerenja svake jažice oduzima se otpor same membrane i množi s površinom membrane (1,12 cm²). Dobiva se TEER vrijednost izražena u Ω cm², kao indikator integriteta i diferencijacije epitela. Prilikom izlaganja zraku na Transwell[®] ploču se umeće metalna ploča kako bi se volumen receptorskog odjeljka povećao na 2000 μL. Nakon 3 dana izloženosti zraku stanični je model spreman za tretiranje. Dodaje se po 500 μL hranidbenog medija u donorske odjeljke i mjeri se otpor. Stanice se ispiru s po 200 μL PBS-a i dodaje se 500 μL HBSS-a (pH 7,4) u donorski te 1500 μL u receptorski odjeljak, a potom se stanice inkubiraju tijekom 30 minuta na 37 °C i ponovno im se mjeri otpor. Slijedi uklanjanje HBSS-a iz donorskog odjeljka i dodavanje po 500 μL ispitivanih uzoraka te inkubacija tijekom 30 minuta na 37 °C. Kao uzorci za tretiranje modela korištene su nanoemulzije razrijeđene 10 puta u HBSS puferu (pH 7,4). Nakon tretiranja stanice se ispiru s po 200 μL PBS-a. U receptorski odjeljak dodaje se 2000 μL hranidbenog medija i slijedi izlaganje stanica zraku tijekom noći.

3.2.7. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija

Izlaganje *in vitro* modela epitela humane rožnice nanoemulzijama provedeno je tijekom 30 minuta, a vijabilnost stanica određena je 24 sata nakon izlaganja kolorimetrijskom MTT testu. U ovom diplomskom radu to je izrađeno tako da je dodano po 700 μl otopine MTT (0,5 mg/mL, AppliChem) u hranidbenom mediju DMEM/F-12 bez dodataka u donorski i u receptorski odjeljak i inkubirano tijekom 3 sata. Nakon toga bilo je potrebno ukloniti medij,

dodati po 700 μL izopropanola u donorski i u receptorski odjeljak kako bi se otopili kristali formazana. Zatim je pipetirano po 100 μL otopine formazana na ploču s 96 jažica te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 570 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica (1420 Multilabel counter Victor³, Perkin Elmer, SAD).

3.2.8. Reološka mjerenja

U ovom diplomskom radu prije reoloških mjerenja bilo je potrebno pripremiti uzorke tako da je bilo potrebno pripremiti 20% (w/w) disperziju mucina u STF- u koja je miješana na magnetskom mješaču preko noći. Sastav STF-a opisan je u poglavlju 3.1. Nakon pripreme 20%-tne disperzije mucina u STF-u , disperzija je pomiješana s nanoemulzijama u odnosu 1:1 (w/w) te je dobivena smjesa miješana tijekom 15 minuta na magnetskom mješaču (750 rpm) na sobnoj temperaturi, a nakon toga su uzorci ostavljeni u mirovanju na sobnoj temperaturi sat vremena prije početka mjerenja (da bi se ponovno postigla struktura razorena miješanjem). Kontrolni uzorci (20%-tna disperzija mucina pomiješana s pročišćenom vodom u omjeru 1:1 (w/w) i nanoemulzije pomiješane sa STF-om u omjeru 1:1 (w/w)) izrađeni su na isti način. Nakon toga na reometru (model MCR 102, mjerno tijelo CP-50, Anton Paar, Austrija) je izmjerena krivulja tečenjapri 34 °C i gradijentu brzine smicanja (engl. *shear rate*) 0,1-100 s^{-1} .

U ovom diplomskom radu korištena je jednadžba:

$$\eta_{zbog\ muko\ adhezije} = \eta_{ukupno} - \eta_{mucin\ 10\%} - \eta_{nanoemulzija}$$

pri čemu je η_{ukupno} - viskoznost smjese nanoemulzija i 20% -tne (w/w) disperzije mucina (1:1),

$\eta_{mucin\ 10\%}$ - viskoznost 10% -tne (w/w) disperzije mucina,

$\eta_{nanoemulzija}$ – viskoznost smjese nanoemulzija i STF (1:1)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Razvoj topikalnih oftalmičkih lijekova veliki je izazov zbog slabe topljivosti oftalmičkih djelatnih tvari te zbog fizioloških i anatomskih barijera oka. Kationske U/V nanoemulzije jedan su od novijih pristupa u izradi kapi za oko, a njihova prednost je u tome što pozitivan naboj na površini kapljica unutarnje faze ulazi u interakciju s negativno nabijenom površinom oka i time se produljuje njihovo zadržavanje na površini oka (Tamilvanan i Benita, 2004). Postoje različite vrste nositelja pozitivnog naboja, a u ovom diplomskom radu korišten je kationski lipid stearylamin. Svrha rada je bila fizičko-kemijska karakterizacija, ispitivanje mukoadhezivnih svojstva te ispitivanje biokompatibilnosti izrađenih nanoemulzija sa stearylaminom na višeslojnom *in vitro* modelu humanog epitela rožnice.

4.1. Priprava nanoemulzija sa stearylaminom

Nanoemulzije sa stearylaminom su pripravljene metodom mikrofluidizacije. Nakon miješanja na Ultra Turraxu emulzije su poprimile mliječno bijelu boju, a nakon procesa mikrofluidizacije one su zadržale svoju mliječno bijelu boju i bile su homogene. Ovakav izgledje uobičajen i očekivan za nanoemulzije, a prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Izgled nanoemulzija sa stearylaminom na dan izrade.

4.2. Veličina kapljica

Nanoemulzijama je izmjerena veličina kapljica odmah nakon izrade te 30 dana nakon skladištenja pri 4°C radi provjere stabilnosti sustava. Svaki uzorak napravljen je u duplikatu, a svaki duplikat mjeren je 3 puta te je uzeta srednja vrijednost mjerenja. Rezultati dobiveni mjerenjem veličine kapljica odmah nakon izrade nanoemulzija dani su u Tablici 3.

Tablica 3. Ovisnost veličine kapljica (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 2$) o udjelu stearilamina.

Udio stearilamina	Veličina kapljica (nm)
0%	81,20 \pm 0,32
0,01%	81,00 \pm 0,40
0,05%	86,00 \pm 0,30
0,1%	89,95 \pm 0,71
0,3%	95,55 \pm 0,69

Ono što je vidljivo iz rezultata je to da su nanoemulzije uspješno izrađene pomoću mikrofluidizatora te da se veličina kapljica kreće u rasponu od 81,00 nm do 95,55 nm ovisno o udjelu stearilamina. Povećanjem udjela stearilamina blago se povećava veličina kapljica. U jednoj studiji proveden je pokus u kojem se ispitivao utjecaj uljne faze na veličinu kapljica unutarnje faze nanoemulzija. Priređene su dvije različite vrste nanoemulzija koje su imale u svom sastavu natrijev dodecilsulfat, polietilenglikol, vodu i ulje, pri čemu je jedna nanoemulzija sadržavala ulje kikirikija, a druga heksadekan. Ono što je zanimljivo je to što su nanoemulzije priređene pri istim procesnim uvjetima (na mikrofluidizatoru kroz 5 ciklusa pri 1000 bara) i koncentraciji surfaktanta, a razlikovale su se samo u vrsti ulja uljne faze. Veličine kapljica unutarnje faze nanoemulzija s heksadekanom bila je za 40 nm manja od veličine kapljica nanoemulzija s uljem kikirikija iz čega se može zaključiti da s obzirom na to da je ravnotežna međufazna napetost niža kod ulja kikirikija i vode nego kod heksadekana i vode, jedino preostalo objašnjenje za razliku u veličini kapljica je razlika u viskoznosti uljne faze. Ulje kikirikija je značajno viskoznije od heksadekana. U svakom homogenizatoru postoji optimalan raspon η_D/η_C (omjer viskoznosti dispergirane/kontinuirane faze) kod kojeg dolazi do najučinkovitijeg usitnjavanja kapljica, u ovom pokusu je otkriveno da je pri primjenjenoj

sili smicanja nanoemulzija s heksadekanom bila unutar optimalnog η_D/η_C raspona, dok je nanoemulzija s uljem kikirikija bila značajno iznad raspona. Iz toga proizlazi zaključak da je zbog veće viskoznosti ulja kikirikija teže proizvesti jednaku veličinu kapljica te da je potrebna veća sila smicanja (Wooster i sur., 2008). Zbog toga postoji mogućnost da je u ovom diplomskom radu dodatkom stearilamina, koji je pri sobnoj temperaturi u krutom stanju, došlo do porasta viskoznosti uljne faze, a primjenom jednake sile na sve uzorke, došlo je do slabijeg usitnjavanja kapljica s većim udjelom stearilamina jer što je viskoznost unutarnje faze veća potrebna je veća sila za razbijanje većih kapljica na manje.

4.3. Indeks polidisperznosti (PDI)

Svaki uzorak napravljen je u duplikatu, a svaki duplikat mjeren je 3 puta te je uzeta srednja vrijednost mjerenja. Rezultati određivanja indeksa polidisperznosti nanoemulzija nakon izrade su prikazani Tablicom 4.

Tablica 4. Ovisnost indeksa polidisperznosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 2$) o udjelu stearilamina.

Udio stearilamina	PDI
0%	0,11 \pm 0,01
0,01%	0,14 \pm 0,01
0,05%	0,23 \pm 0,01
0,1%	0,24 \pm 0,01
0,3%	0,25 \pm 0,01

Rezultati mjerenja pokazuju da se povećanjem udjela stearilamina u nanoemulzijama povećava i indeks polidisperznosti. PDI je mjera za raspodjelu veličina kapi i ukazuje na kvalitetu ili homogenost nanoemulzije (Đorđević i sur., 2013). Kreće se od 0 (monodisperzna) do 1 (relativno široka raspodjela). Na primjer, za parenteralne nanoemulzije vrijednosti PDI do 0,25 smatraju se prihvatljivim (Đorđević i sur., 2013). Prema tome sve nanoemulzije su odgovarajuće homogenosti i zadovoljavajuće kvalitete.

4.4. Zeta-potencijal

Svaki uzorak napravljen je u duplikatu, a svaki duplikat mjeren je 3 puta te je uzeta srednja vrijednost mjerenja. Rezultati određivanja zeta-potencijala nanoemulzijama odmah nakon izrade prikazani su Tablicom 5.

Tablica 5. Ovisnost zeta-potencijala (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 2$) o udjelu stearilamina.

Udio SA	Zeta-potencijal (mV)
0%	$-1,97 \pm 0,41$
0,01%	$+3,05 \pm 0,36$
0,05%	$+13,2 \pm 0,55$
0,1%	$+20,34 \pm 1,61$
0,3%	$+25,52 \pm 1,81$

Rezultati ovih mjerenja se slažu s rezultatima, u stručnoj literaturi, koji govore da zeta-potencijal ovisi o pH vrijednosti otopine tako što postaje pozitivniji u lužnatijim medijima te da zeta-potencijal ovisi o koncentraciji pojedinih sastojaka zbog ukupne dostupne površine (Bhattacharjee, 2016.). Povećanjem udjela stearilamina u nanoemulzijama dolazi do povećanja zeta-potencijala, što znači da pozitivan naboj aminoskupine u strukturi stearilamina doprinosi pozitivnijem zeta-potencijalu. Izmjerene vrijednosti zeta-potencijala niže su od 30 mV što ove nanoemulzije čini tek blago pozitivno nabijenima, odnosno njihova gustoća naboja na površini kapljica nije dovoljna za značajniju elektrostatsku stabilizaciju, a u literaturnim pokusima daljnjim povećanjem stearilamina dolazi do postizanja platoa na vrijednosti zeta-potencijala od +50 (Fraga i sur., 2008). Ipak, izrađene nanoemulzije su stabilne unatoč tome što je zeta-potencijal niži od 30 mV jer su sterički stabilizirane Kolliphorom EL.

4.5. pH vrijednost

U Tablici 6. nalaze se rezultati mjerenja pH odmah nakon izrade nanoemulzija.

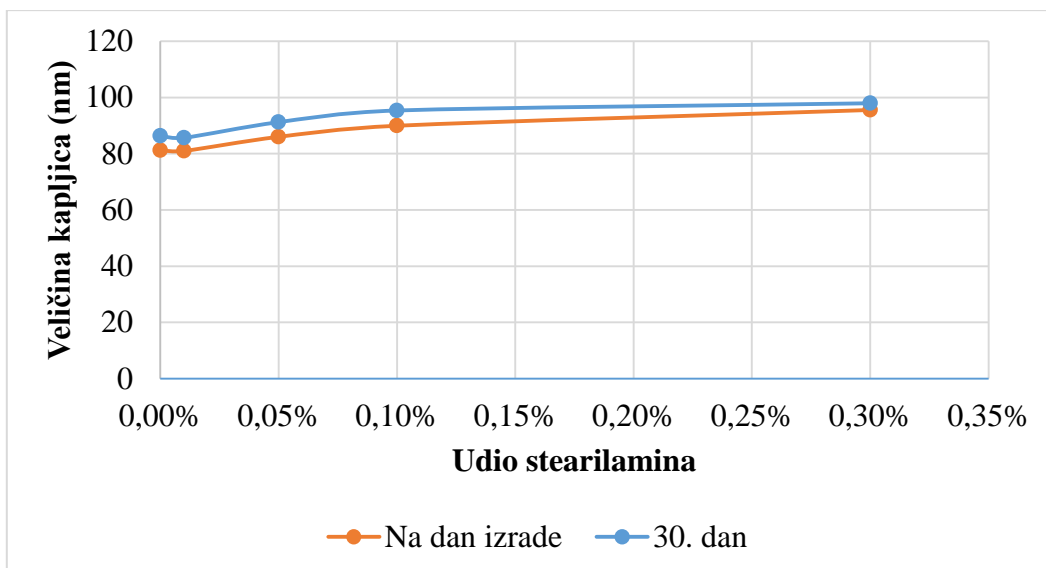
Tablica 6. Ovisnost pH vrijednosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija, $n = 2$) o udjelu stearilamina.

Udio SA	pH
0%	6,21 \pm 0,33
0,01%	6,21 \pm 0,04
0,05%	6,58 \pm 0,13
0,1%	7,63 \pm 0,28
0,3%	8,87 \pm 0,10

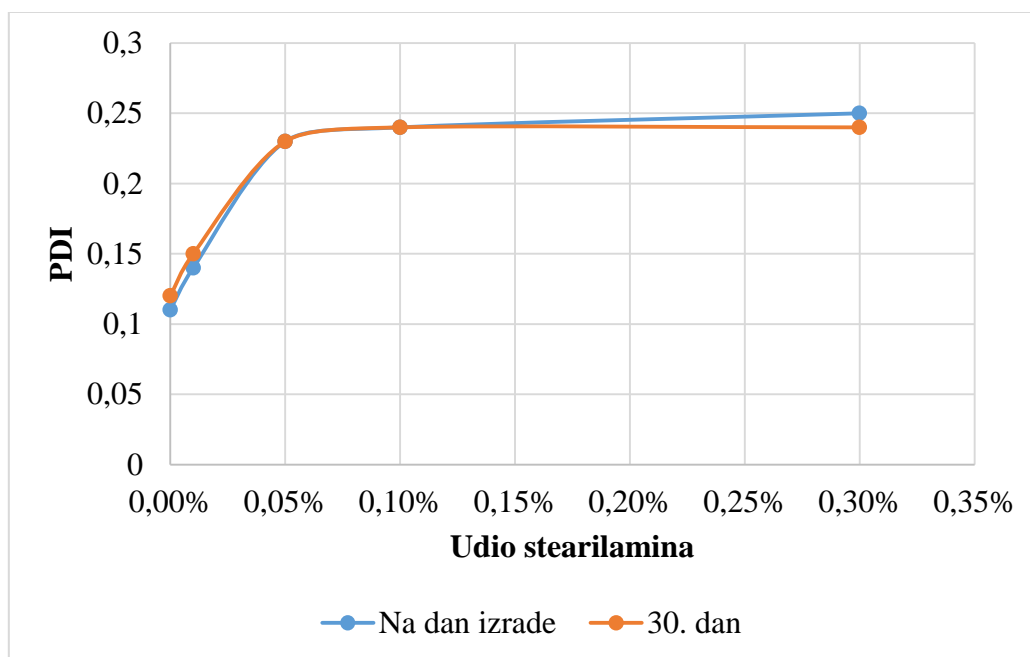
Fiziološki pH suza je neutralan, reguliran tvarima otopljenim u suzama te se kreće se u rasponu od 7,14 do 7,82. Optimalan pH oftalmičkog pripravka je 7,2 (Pepić i sur., 2012). Ipak pH vrijednost oftalmičkog pripravka može se kretati u rasponu od 4 do 8 koji oko može podnijeti, no ukoliko pripravak nije u tom okviru može se javiti nelagoda, iritacija, a bioraspoloživost lijeka može se smanjiti zbog povećanog suzenja oka (Baranowski i sur., 2014). Iz priloženih rezultata vidljivo je da je pH izrađenih nanoemulzija prikladan za oftalmičku primjenu osim nanoemulzije s udjelom stearilamina od 0,3% čiji je pH iznad 8. Također, mjerenje pH je bitno radi ispitivanja stabilnosti nanoemulzija nakon određenog vremena skladištenja, jer promjena pH vrijednosti može biti posljedica određenih kemijskih procesa unutar samog pripravka (Đorđević i sur., 2013). Isto tako, iz rezultata je vidljivo da povećanjem udjela stearilamina dolazi do povećanja pH, a to se može objasniti tako što primarna amino skupina stearilamina koja je prisutna na samoj površini kapljica uljne faze veže vodikove ione iz vanjske vodene faze nanoemulzije, čime se smanjuje koncentracija slobodnih vodikovih iona u vanjskoj fazi nanoemulzije i pH vrijednost raste, a da bi se dobila potpuna ionizacija stearilamina potrebno je pH podesiti na 7. To je u skladu s literaturom (Fraga i sur., 2008).

4.6. Stabilnost nanoemulzija

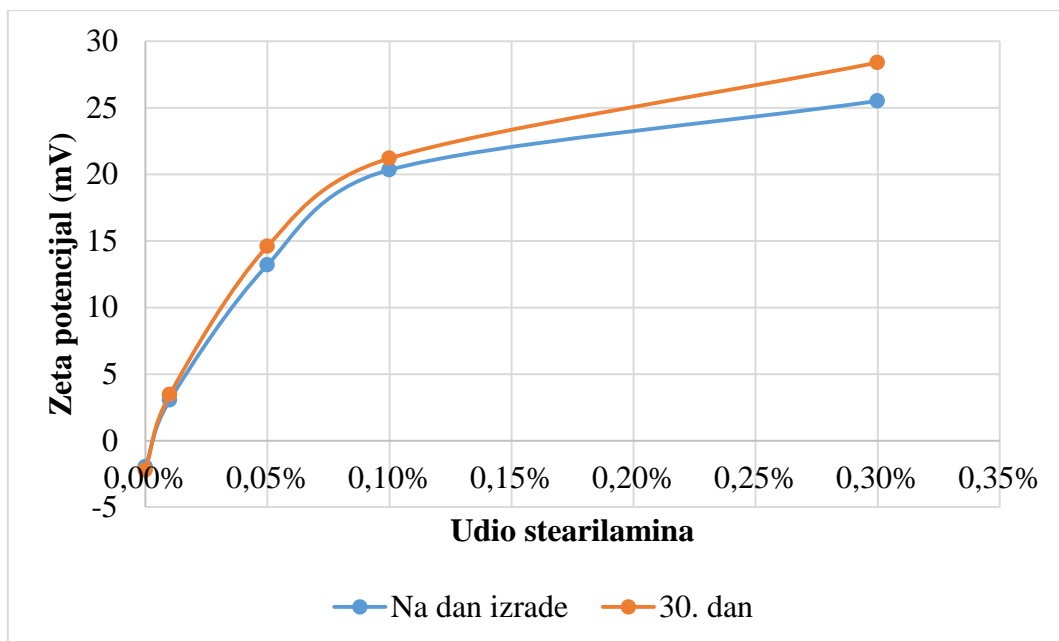
U ovom diplomskom radu stabilnost nanoemulzija bila je ispitana nakon 30 dana skladištenja uzoraka u staklenim bočicama u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C. Način ispitivanja stabilnosti bilo je ponovno mjerenje veličine kapljica, indeksa polidisperznosti, zeta-potencijala i pH vrijednosti te njihova usporedba s prethodno izmjerenim vrijednostima odmah nakon izrade nanoemulzija. Rezultati ovih mjerenja i njihova usporedba prikazani su na sljedećim grafičkim prikazima.



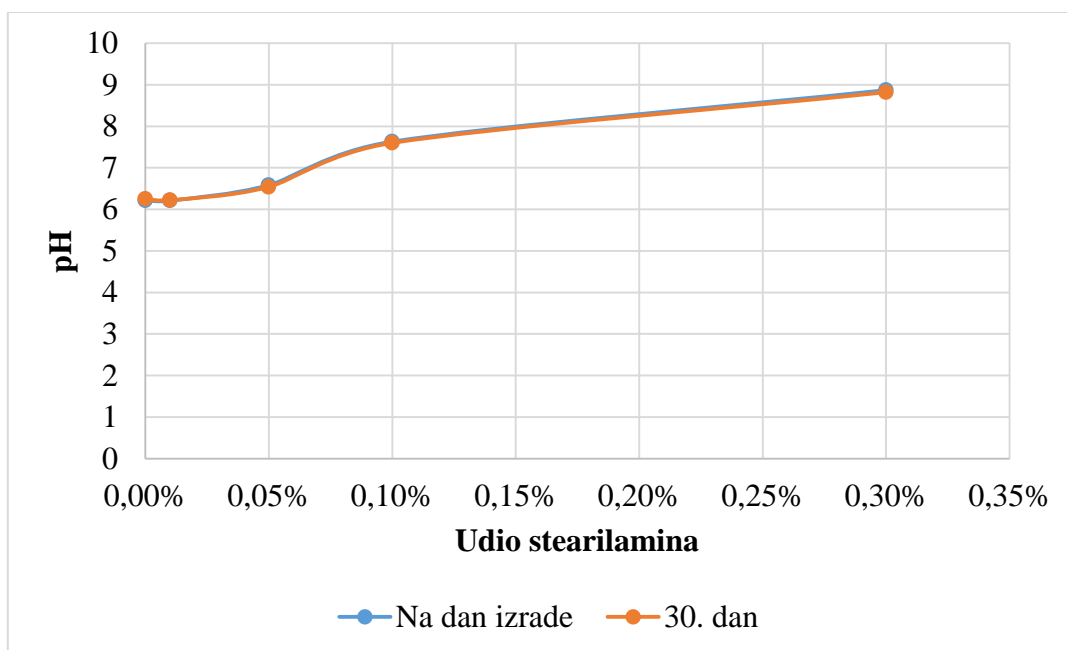
Slika 8. Usporedba ovisnosti veličine kapljica o udjelu stearylamina na dan izrade i nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, (n = 2).



Slika 9. Usporedba ovisnosti indeksa polidisperznosti o udjelu stearylamina na dan izrade i nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, (n = 2).



Slika 10. Usporedba ovisnosti zeta-potencijala o udjelu stearylamina na dan izrade i nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, (n = 2).

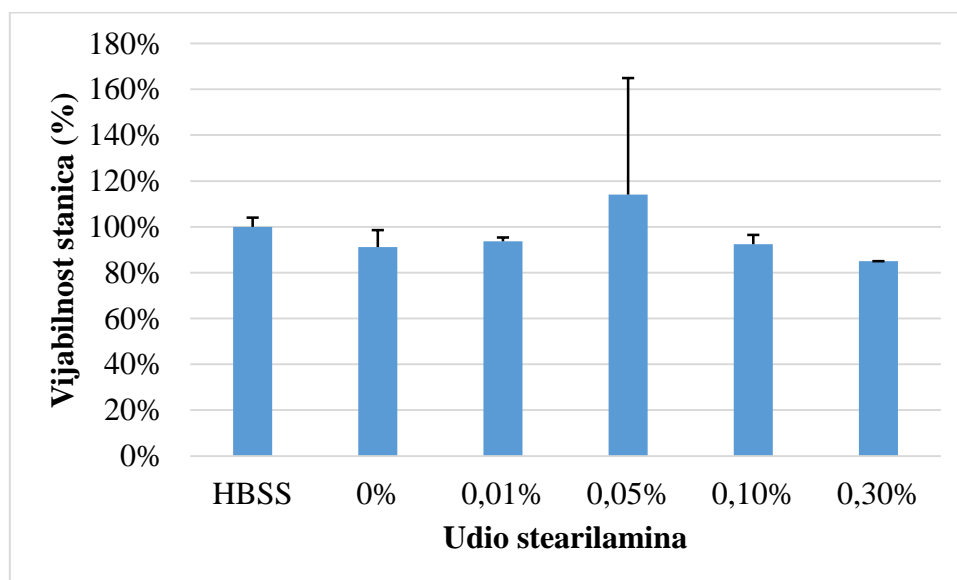


Slika 11. Usporedba ovisnosti pH nanoemulzija o udjelu stearylamina na dan izrade i nakon 30 dana skladištenja pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost, (n = 2).

Iz ovih grafičkih prikaza vidljivo je da su nanoemulzije izrađene u ovom diplomskom radu stabilne i nakon 30 dana. Niti u jednom od ovih ispitivanja ne pokazuje se značajna promjena u odnosu na vrijednosti izmjerene neposredno nakon izrade nanoemulzija. Veličina kapljica i dalje je ostala ispod 100 nm što znači da su kapljice i dalje u nanometarskom području, indeks polidisperznosti ostao je niži od 0,25 što znači da su nanoemulzije zadržale svoju kvalitetu i homogenost. Zeta-potencijal nije se značajno promijenio kao ni pH vrijednost, što znači da u ispitivanom razdoblju nije došlo do značajnijih kemijskih procesa unutar samih nanoemulzija. Također samim vizualnim pregledom nanoemulzija vidi se da nije došlo do promjena u izgledu niti do odvajanja faza.

4.7. Biokompatibilnost nanoemulzija

Biokompatibilnost nanoemulzija ispitana je na višeslojnom *in vitro* modelu humanog epitela rožnice, nakon izlaganja modela nanoemulzijama tijekom 30 minuta.



Slika 12. Vijabilnost staničnog modela epitela humane rožnice (prikazana kao % u odnosu na kontrolu tretiranu HBSS puferom) nakon 30-minutnog izlaganja nanoemulzijama s različitim udjelima stearilamina. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n = 2).

Vijabilnost modela izračunata je pomoću formule:

$$vijabilnost\ modela = \frac{\Delta aps(uzorak)}{\Delta aps(kontrolni\ uzorak)} \times 100\ (%)$$

gdje je Δaps (*uzorak*) vrijednost apsorbancije izmjerene nakon inkubacije modela određenim uzorkom, Δaps (*kontrolni uzorak*) je srednja vrijednost apsorbancije izmjerene nakon inkubacije modela HBSS-om, a ta je vrijednosti uzeta kao 100%-tna vijabilnost modela.

Vijabilnost je određena 24 sata nakon tretiranja nanoemulzijama kolorimetrijskim MTT testom, te je iznosila oko 90% čime je dokazana biokompatibilnost nanoemulzija *in vitro* (vijabilnost > 60% označava biokompatibilnost – Wilson i sur., 2014). Potrebne su dodatne *in vivo* studije koje bi potvrdile ovaj zaključak.

4.8. Mukoadhezija

Krivulja tečenja uzoraka dobivenih miješanjem nanoemulzija s disperzijom mucina te kontrolnih uzoraka izmjerena je u duplikatu. Za izračun komponente viskoznosti zbog mukoadhezije korištena je vrijednost viskoznosti dobivena pri gradijentu brzine smicanja od 100 s^{-1} . Mjerenjem viskoznosti 10%-tne (*w/w*) disperzije mucina pri gradijentu brzine smicanja od 100 s^{-1} dobivena je vrijednost $\eta_{mucin\ 10\%} = 180,47 \pm 5,92 \text{ mPa} \times \text{s}$. Komponente viskoznosti zbog mukoadhezije izračunate su pomoću formule navedene u poglavlju 3.2.8. Rezultati su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Ovisnost komponente viskoznosti nanoemulzija zbog mukoadhezije o udjelu stearilamina.

Udio SA	η (Nanoemulzije + STF) / (mPa x s)	η (Nanoemulzije + 20% (w/w) disperzija mucina) / (mPa x s)	$\eta_{\text{zbog mukoadhezije}}$ / (mPa x s)
0% (1)	0,88± 0,02	283,82± 36,47	102,47
0,01% (1)	0,89± 0,02	290,38± 10,35	109,02
0,05% (1)	0,89± 0,01	262,37± 12,19	81,01
0,1% (1)	0,98 ± 0,04	271,67 ±14,68	90,22
0,3% (1)	1,40± 0,48	309,49 ± 35,45	127,62

Izračunate vrijednosti komponenata viskoznosti zbog mukoadhezije značajno odstupaju između ponovljenih mjerenja. Iz rezultata je vidljivo kako i sama nanoemulzija bez stearilamina pokazuje mukoadhezivna svojstva ($\eta_{\text{zbog mukoadhezije}} = 102,47 \text{ mPa} \times \text{s}$), unatoč blago negativnom naboju na površini kapljica. Iako nanoemulzija s najvećim udjelom stearilamina pokazuje i najveću komponentu viskoznosti zbog mukoadhezije, što je u skladu s očekivanjima, na temelju ostalih rezultata nije moguće zaključiti kako dodatak stearilamina ima utjecaj na mukoadhezivna svojstva izrađenih nanoemulzija. Iako je ova reološka metoda prikladna za ispitivanje mukoadhezivnih svojstava uzoraka s različitim polimerima, možda ipak nije prikladna za uzorke koji ne sadrže polimere. Mukoadhezivna svojstva nanoemulzija sa stearilaminom potrebno je dodatno ispitati nekom drugom *in vitro* ili *in vivo* metodom kako bi bilo moguće donijeti konkretniji zaključak o utjecaju dodatka stearilamina na mukoadhezivnost formulacija.

5. ZAKLJUČAK

- Uspješno su izrađene U/V nanoemulzije s različitim udjelom stearilamina, kao nositeljem pozitivnog naboja, uz pomoć mikrofluidizatora. Nanoemulzije su homogene, opalescirajućeg izgleda, a u svom sastavu osim stearilamina sadrže i Miglyol 812, Kolliphor EL i pročišćenu vodu.
- Prosječna veličina kapljica nanoemulzija se kreće u rasponu od $81,00 \pm 0,40$ nm do $95,55 \pm 0,69$ nm. Povećanjem udjela stearilamina dolazi do blagog povećanja veličine kapljica nanoemulzija, a mogući razlog samo blagog porasta veličine je povećanje viskoznosti unutarnje faze kod nanoemulzija s većim udjelom stearilamina.
- Indeks polidisperznosti se kreće u rasponu od $0,11 \pm 0,01$ do $0,25 \pm 0,01$, također se povećava povećanjem udjela stearilamina. Prema ovim rezultatima sve izrađene nanoemulzija su odgovarajuće homogenosti i zadovoljavajuće kvalitete.
- Vrijednost zeta-potencijala je u rasponu od $-1,97 \pm 0,41$ mV do $+25,52 \pm 1,81$ mV, što znači da pozitivan naboj aminoskupine u strukturi stearilamina doprinosi pozitivnijem zeta-potencijalu. Iako je zeta-potencijal niži od 30 mV nanoemulzije su stabilne jer sterički stabilizirane Kolliphorom EL.
- pH vrijednost je u rasponu od $6,21 \pm 0,325$ do $8,87 \pm 0,099$, što znači da su sve osim nanoemulzije s 0,3% stearilamina prikladne za oftalmičku primjenu. Također iz rezultata je vidljivo da povećanjem udjela stearilamina dolazi do povećanja pH, a to moguće objašnjenje je primarna amino skupina stearilamina koja veže vodikove ione iz vanjske vodene faze nanoemulzije, čime se smanjuje koncentracija slobodnih vodikovih iona u vanjskoj fazi nanoemulzije i pH vrijednost raste.

- Sve nanoemulzije su pokazale stabilnost nakon 30 dana skladištenja pri temperaturi od 4 °C te nije došlo do značajnih promjena u izmjerenim vrijednostima. Veličina kapljica je ostala u nanometarskom području, a nanoemulzije su ostale homogene, zadržale su svoju kvalitetu i nije došlo do značajnijih kemijskih procesa unutar nanoemulzija stajanjem.
- Korištenjem višeslojnog *in vitro* modela epitela humane rožnice dokazana je biokompatibilnost izrađenih nanoemulzija, pri čemu je vijabilnost nakon tretiranja kolorimetrijskim MTT testom oko 90%. Potrebne su dodatne *in vivo* studije.
- Prilikom ispitivanja mukoadhezivnosti, nanoemulzija s najvećim udjelom stearylamina pokazala je najveću komponentu viskoznosti zbog mukoadhezije, no na temelju ostalih rezultata nije moguće zaključiti kako dodatak stearylamina ima utjecaj na mukoadhezivna svojstva izrađenih nanoemulzija. Mukoadhezivna svojstva nanoemulzija sa stearylaminom potrebno je dodatno ispitati nekom drugom *in vitro* ili *in vivo* metodom kako bi bilo moguće donijeti konkretniji zaključak o utjecaju dodatka stearylamina na mukoadhezivnost formulacija.
- Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene kationskih nanoemulzija sa stearylaminom kao terapijskih sustava za uklanjanje lijekova za oftalmičku primjenu i njihovo produljeno zadržavanje na površini oka.

6. LITERATURA

Anton N, Vandamme T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res*, 2011, 28, 978–985.

Baranowski P, Karolewicz B, Gajda M, Pluta J. Ophthalmic drug dosage forms: characterization and research methods. *The Scientific World Journal*, Volume 2014; 861-904.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of controlled release*, 2016, 235, 337-351.

Dorđević S, Cekić N, Isailović T, Milić J, Vuleta G, Lazić M, Savić S. Nanoemulsions produced with varied type of emulsifier and oil content: An influence of formulation and process parameters on the characteristics and physical stability. *Hemijska industrija*, 2013, 67, 795-809.

Fraga M, Laux M, Zandona B, Santos GR, dos Santos Giuberti C, de Oliviera MC, Matte U, Ferreira Teixeira H. Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. *J Drug Del Sci Tech*, 2008, 18, 398-403.

Fuente M, Ravina M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso M.J, Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics, *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62, 100-117.

Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, Liu J, Gan Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290-296.

García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. 2016, 365-388.

Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 2016, 12, 2826-2841.

Hassan E.E, Gallo J. A Simple Rheological Method for the *in Vitro* Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength, *Pharmaceutical Research*, 1990, 7, 491-495

Juretić M, Jurišić Dukovski B, Krtalić I, Reichl S, Cetina- Čižmek B, Filipović- Grčić J, Lovrić J, Pepić I. HCE-T cell-based permeability model: A wellmaintained or a highly variable barrier phenotype? *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104, 23-30.

Klang S.H, Frucht-Pery J, Hoffman A and Benita S, Physicochemical Characterization and Acute Toxicity Evaluation of a Positively-charged Submicron Emulsion Vehicle, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1994, 46, 986–993.

Klang V,Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions, *J. DRUG DEL. SCI. TECH.*, 2011, 21, 55-76.

Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue JS. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, *Novasorb. J Drug Deliv*, 2012, 10, 1-16.

Lallemand F, Schmitt M, Bourges J.L, Gurny R, Benita S, Garrigue J.S, Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts, *Eur J Pharm Biopharm*, 2017,117, 14-28.

O'neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD. A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods. *J Lipid Res*, 1998, 39, 2086-2090.

Ostróžka-Ciešlik A, Sarecka-Hujar B. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, Elsevier Inc., 2017, 139-158.

Pauly A, Meloni M, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Baudouin C. Multiple endpoint analysis of the 3D-Reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: Early detection of toxic damage. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50, 1644-1652.

Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Modeli za ispitivanje permeabilnosti i predviđanje bioraspoloživosti lijeka u oku, *Farm Glas*, 2012, 68, 177-205

Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čižmek B, Reichl S, Filipović Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models, *Drug Discovery Today*, 2014, 19, 31-44

Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso MJ, De la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 95, 279-293.

Rossi S, Vigani B, Bonferoni M.C, Sandri G, Caramella C, Ferrari F. Rheological analysis and mucoadhesion: A 30 year-old and still active combination, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 156, 232–238.

Ruponen M, Urtti A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery, *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 96, 442-446.

Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252, 28-49.

Stevenson D, Tauber J, Reis B.L, Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group, *Ophthalmology*, 2000, 107, 967-974.

Subrizi A, Del Amo E.M, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Ruponen M, Urtti A. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties, *Drug Discov Today*, 2019, 00, 1-12.

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 58, 357–368.

Walenga R.L, Babiskin A.H, Zhang X, Absar M, Zhao L, Lionberger R.A, Impact of Vehicle Physicochemical Properties on Modeling-Based Predictions of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion Bioavailability and Tear Film Breakup Time, *J Pharm Sci*, 2019, 108, 620-629

Wilson S.L, Ahearne M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing, *Toxicology*, 2015, 327, 32–46.

Wooster T.J, Golding M, Sanguansri P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*, 2008, 24, 12758-12765.

Zetasizer 2000/3000: Zeta potential measurements; Manual number MAN0150, UK, Malvern Instruments Ltd, 2000, str. 1.2.

7. SAŽETAK

Razvoj topikalnih oftalmičkih pripravaka veliki je izazov zbog slabe topljivosti oftalmičkih djelatnih tvari te anatomskih i fizioloških barijera oka. Jedan od rješenja za taj problem mogle bi biti nanoemulzije, koje su relativno novi i još nedovoljno istraženi terapijski sustavi. U svrhu ovog diplomskog rada izrađene su kationske U/V nanoemulzije kojima je stearylamin nositelj pozitivnog naboja, a Kolliphor EL surfaktant koji ih je dodatno sterički stabilizirao. Pozitivni naboj na površini uljnih kapljica s uklopljenom djelatnom tvari, omogućuje kationskim nanoemulzijama produljeno zadržavanje, zahvaljujući elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenom površinom oka. U ovom diplomskom radu nanoemulzije sa stearylaminom izrađene su pomoću mikrofluidizatora, a zatim su im bila ispitana fizičko-kemijska svojstva i biokompatibilnost. Provedena su mjerenja koja su pokazala da povećanjem udjela stearylamina u nanoemulzijama dolazi do povećanja veličine, indeksa polidisperznosti, zeta-potencijala i pH vrijednosti. Isto tako, vrijednosti ispitivanih parametara su bile unutar odgovarajućih kriterija za oftalmičke pripravke. Kako bi im se ispitala stabilnost provedena su ponovljena mjerenja istih parametara nakon 30 dana skladištenja nanoemulzija pri 4 °C, a rezultati su pokazali da su nanoemulzije zadržale stabilnost i homogenost te da nisu pokazale značajnu promjenu u odnosu na mjerenja na dan izrade. Nanoemulzijama je dokazana biokompatibilnost na višeslojnom *in vitro* modelu humanog epitela rožnice, pri čemu je korištena HCE-T stanična linija uzgajana na Transwell[®] pločama, a vijabilnost modela je, nakon izlaganja određena kolorimetrijskim MTT testom, iznosila oko 90%. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potencijal primjene kationskih nanoemulzija sa stearylaminom kao tehnološkog oblika za uklapanje teško topljivih oftalmičkih djelatnih tvari te njihovo produženo zadržavanje na površini oka bez štetnih učinaka.

SUMMARY

The development of topical ophthalmic formulations is a major challenge due to the low solubility of ophthalmic active substances and the anatomical and physiological barriers of the eye. One solution to this problem may be development of nanoemulsions, which is a relatively new and insufficiently investigated drug delivery system. For the purposes of this diploma thesis, cationic O/W nanoemulsions were prepared, which included the stearylamine as positively charged surfactant, and Kolliphor EL as surfactant which additionally sterically stabilized them. Positive charge on the surface of the oil droplets with the active ingredient, allows cationic nanoemulsions to improve drug retention, due to electrostatic interactions with the negatively charged surface of the eye. In this diploma thesis the nanoemulsions with stearylamine were prepared using a microfluidizer and then tested for their physiochemical properties and biocompatibility. With the increase in the content of stearylamine in nanoemulsions increases the size, index of polydispersity, zeta-potentials and pH values. Likewise, the values of the examined parameters were within the expected limits for ophthalmic formulations. In order to test stability of prepared nanoemulsions, measurements of the same parameters were repeated after 30 days of storage of nanoemulsion at 4°C, and the results showed that the nanoemulsions maintained their stability and did not show a significant change in homogeneity compared to the measurements that were made on the day of preparation. Nanoemulsions were shown to be biocompatible using the multilayer *in vitro* model of human corneal epithelium, using a HCE-T cell line grown on Transwell® plates, and the viability of the model determined with a colorimetric MTT test was approximately 90%. The results of this study indicate the potential of cationic nanoemulsion with stearylamine as a delivery system for drugs with low water solubility and which prolongs the drug retention on the surface of the eye without toxic effects.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Razvoj oftalmičkih nanoemulzija sa stearylaminom

Ana Bračko

SAŽETAK

Razvoj topikalnih oftalmičkih pripravaka veliki je izazov zbog slabe topljivosti oftalmičkih djelatnih tvari te anatomskih i fizioloških barijera oka. Jedan od rješenja za taj problem mogle bi biti nanoemulzije, koje su relativno novi i još nedovoljno istraženi terapijski sustavi. U svrhu ovog diplomskog rada izrađene su kationske U/V nanoemulzije kojima je stearylamin nositelj pozitivnog naboja, a Kolliphor EL surfaktant koji ih je dodatno sterički stabilizirao. Pozitivni naboj na površini uljnih kapljica s uklopljenom djelatnom tvari, omogućuje kationskim nanoemulzijama produljeno zadržavanje, zahvaljujući elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenom površinom oka. U ovom diplomskom radu nanoemulzije sa stearylaminom izrađene su pomoću mikrofluidizatora, a zatim su im bila ispitana fizičko-kemijska svojstva i biokompatibilnost. Provedena su mjerenja koja su pokazala da povećanjem udjela stearylamina u nanoemulzijama dolazi do povećanja veličine, indeksa polidisperznosti, zeta-potencijala i pH vrijednosti. Isto tako, vrijednosti ispitivanih parametara su bile unutar odgovarajućih kriterija za oftalmičke pripravke. Kako bi im se ispitala stabilnost provedena su ponovljena mjerenja istih parametara nakon 30 dana skladištenja nanoemulzija pri 4 °C, a rezultati su pokazali da su nanoemulzije zadržale stabilnost i homogenost te da nisu pokazale značajnu promjenu u odnosu na mjerenja na dan izrade. Nanoemulzijama je dokazana biokompatibilnost na višeslojnom *in vitro* modelu humanog epitela rožnice, pri čemu je korištena HCE-T stanična linija uzgajana na Transwell® pločama, a vijabilnost modela je, nakon izlaganja određena kolorimetrijskim MTT testom, iznosila oko 90%. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potencijal primjene kationskih nanoemulzija sa stearylaminom kao tehnološkog oblika za uklapanje teško topljivih oftalmičkih djelatnih tvari te njihovo produženo zadržavanje na površini oka bez štetnih učinaka.

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

Rad sadrži: 42 stranica, 12 grafičkih prikaza, 7 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzija, mikrofluidizacija, stearylamin, Kolliphor EL, HCE-T stanična linija

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Hafner, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Development of ophthalmic nanoemulsions with stearylamin

Ana Bračko

SUMMARY

The development of topical ophthalmic formulations is a major challenge due to the low solubility of ophthalmic active substances and the anatomical and physiological barriers of the eye. One solution to this problem may be development of nanoemulsions, which is a relatively new and insufficiently investigated drug delivery system. For the purposes of this diploma thesis, cationic O/ W nanoemulsions were prepared, which included the stearylamine as positively charged surfactant, and Kolliphor EL as surfactant which additionally sterically stabilized them. Positive charge on the surface of the oil droplets with the active ingredient, allows cationic nanoemulsions to improve drug retention, due to electrostatic interactions with the negatively charged surface of the eye. In this diploma thesis the nanoemulsions with stearylamine were prepared using a microfluidizer and then tested for their physicochemical properties and biocompatibility. With the increase in the content of stearylamine in nanoemulsions increases the size, index of polydispersity, zeta-potentials and pH values. Likewise, the values of the examined parameters were within the expected limits for ophthalmic formulations. In order to test stability of prepared nanoemulsions, measurements of the same parameters were repeated after 30 days of storage of nanoemulsion at 4°C, and the results showed that the nanoemulsions maintained their stability and did not show a significant change in homogeneity compared to the measurements that were made on the day of preparation. Nanoemulsions were shown to be biocompatible using the multilayer *in vitro* model of human corneal epithelium, using a HCE-T cell line grown on Transwell® plates, and the viability of the model determined with a colorimetric MTT test was approximately 90%. The results of this study indicate the potential of cationic nanoemulsion with stearylamine as a delivery system for drugs with low water solubility and which prolongs the drug retention on the surface of the eye without toxic effects.

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

Thesis includes: 42 pages, 12 figures, 7 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsion, microfluidisation, stearylamin, Kolliphor EL, HCE-T cell line

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

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Hafner, 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: July 2019.