

Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih nanoemulzija s oligomerom kitozana

Jaušić, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:734201>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Matej Jaušić

**Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih
nanoemulzija s oligomerom kitozana**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina. 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Lovrić. Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2019-04- 2174.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na pruženoj mogućnosti za suradnju i iskazanom povjerenju te stručnom vodstvu, podijeljenom znanju i savjetovanju tijekom nastanka ovog Diplomskog rada.

Hvala dr. sc. Biseri Jurišić Dukovski i asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm., na pruženoj pomoći, savjetima i pristupačnosti tijekom eksperimentalnog rada koji se nastavlja na doktorski rad dr. sc. Bisere Jurišić Dukovski.

Hvala svim zaposlenicima Zavoda za farmaceutsku tehnologiju na ukazanoj spremnosti, pomoći i razumijevanju tijekom eksperimentalnog rada.

Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori, razumijevanju, strpljenju i ohrabrivanju tijekom cjelokupnog dosadašnjeg obrazovanja.

Hvala svim mojim prijateljima na neizostavnoj podršci i pomoći u postizanju uspjeha te poticajima na napredak.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Zdravlje i složenost strukture oka.....	1
1.1.1. Zdravlje oka	1
1.2. Bolest suhog oka.....	1
1.2.1. Podloga bolesti.....	2
1.2.2. Mogućnosti liječenja	3
1.2.2.1. Topikalna primjena	3
1.2.2.1.1. Kapi za oko.....	3
1.2.2.1.2. <i>In situ</i> gelirajući sustavi.....	4
1.2.2.1.3. Nanosustavi	4
1.3. Nanoemulzije.....	4
1.3.1. Nanoemulzije – osnove i podjela	4
1.3.2. Karakteristike nanoemulzija.....	5
1.4. Mukoadhezivnost.....	6
1.5. Kationske nanoemulzije u liječenju bolesti suhog oka.....	6
1.5.1. Posebnosti kationskih nanoemulzija	6
1.5.2. Primjeri odobrenih lijekova temeljenih na tehnologiji nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali.....	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Priprava nanoemulzija.....	18
3.2.1.1. Priprava vodene otopine kitozana male molekulske mase (1%, <i>m/m</i>)	18
3.2.1.2. Priprava uljne faze	18

3.2.1.3. Priprava grubih emulzija.....	18
3.2.1.4. Obrada grubih emulzija na mikrofluidizatoru.....	19
3.2.1.5. Priprava nanoemulzija naknadnim dodatkom otopina kitozana	19
3.2.2. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija	20
3.2.2.1. Mjerenje veličine kapljica, raspodjele veličina kapljica i zeta-potencijala.....	20
3.2.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija	20
3.2.3.1. Priprava 20%, <i>m/m</i> disperzije mucina u simuliranoj suznoj tekućini	20
3.2.3.2. Priprava 10%, <i>m/m</i> disperzije mucina u simuliranoj suznoj tekućini te razrjeđenja nanoemulzija s disperzijom mucina (20%, <i>m/m</i>) u simuliranoj suznoj tekućini u omjeru 1:1	20
3.2.3.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija reološkom metodom.....	21
3.2.3.4. Priprava disperzije mucina (1%, <i>m/m</i>) u simuliranoj suznoj tekućini	21
3.2.3.5. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Sekundarne kationske nanoemulzije s oligomerom kitozana	23
4.2. Izrada nanoemulzija.....	26
4.2.1. Veličina kapljica unutarnje faze i indeks polidisperznosti.....	26
4.2.2. Zeta-potencijal.....	31
4.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	35
4.3.1. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija reološkom metodom.....	35
4.3.2. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom određivanjem veličine kapljica i indeksa polidisperznosti.....	36
4.3.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija mjerenjem zeta-potencijala	38

5. ZAKLJUČCI	39
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	40
7. LITERATURA	42
8. SAŽETAK/SUMMARY	49

1. UVOD

1.1. Zdravlje i složenost strukture oka

1.1.1. Zdravlje oka

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2019., barem 2,2 milijarde ljudi u svijetu pati od nekog oblika problema s vidom ili sljepoće, a procjenjuje se kako je gotovo milijardu tih slučajeva bilo moguće spriječiti. Oštećenje vida ne samo da utječe na zdravlje populacije, već uzrokuje i značajne financijske troškove, koji se penju i do 16,5 milijardi USD godišnje samo u Sjedinjenim Američkim Državama. Zato u liječenju oštećenja vida i drugih poremećaja oka postoji značajna potreba razvijanja prikladnih farmaceutskih oblika koji će nadići specifičnosti anatomskih i fizioloških barijera ovog organa (Dave i sur., 2021).

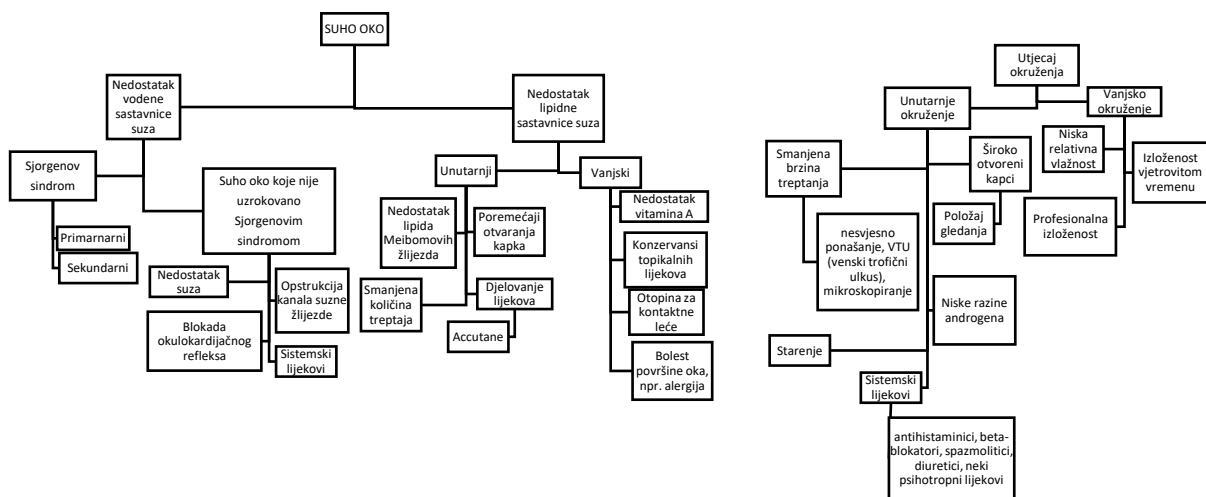
1.2. Bolest suhog oka

Bolest suhog oka kronično je stanje koje zahvaća površinu oka, a bolest karakteriziraju nespecifični simptomi poput suhoće oka, neprestane iritacije, osjećaja pijeska ili stranog tijela u oku, crvenila, boli, suzenja, peckanja i/ili prolaznog zamućenja vida (Rouen i White, 2018). Prema revidiranoj definiciji, bolest suhog oka je multifaktorijalna bolest koju karakterizira gubitak homeostaze suznog filma, a popraćena je simptomima koji zahvaćaju površinu oka, čiji uzročnici mogu biti nestabilnost i hiperosmolarnost suznog filma, upala i oštećenje površine oka te neurosenzorne abnormalnosti (Zemanová, 2021; Chan i sur., 2019; Craig i sur., 2017). To je stanje čest razlog zbog kojeg pacijenti traže medicinsku pomoć, a rijetko se dijagnosticira te se loše liječi (Ræder i sur., 2019). I blagi i ozbiljniji oblik bolesti povezani su s boli, ograničavanjem svakodnevnih aktivnosti, smanjenjem kvalitete života i često depresijom (Zemanová, 2021). Prethodno navedeni simptomi mogu uzrokovati upalu rožnice i spojnice oka ako ih se ne liječi. Najčešći faktori rizika za pojavu ove bolesti uključuju stariju životnu dob, ženski spol, okruženja s niskom vlažnosti zraka, sistemsku primjenu određenih lijekova, autoimune poremećaje, a u današnje vrijeme sve je češća pojava bolesti suhog oka kod mlađe

populacije zbog svakodnevne dugotrajne uporabe digitalnih uređaja (Rouen i White, 2018; optometrytimes.com).

1.2.1. Podloga bolesti

Osnovna podjela bolesti suhog oka je na dvije kategorije: hiposekrecijski tip (zbog nedostatnog izlučivanja vodene sastavnice suza) i hiperevaporacijski tip (ubrzano isparavanje zbog loše kvalitete lipidne sastavnice suza). Unutar ovih kategorija postoji mnogo unutarnjih i vanjskih čimbenika za koje se smatra da doprinose progresiji bolesti suhog oka (Slika 1). Svrha detaljne klasifikacije jest popravljjanje dijagnostičke metodologije, liječenja i budućih istraživanja (Zemanová, 2021; Craig i sur., 2017).



Slika 1. Klasifikacija suhog oka iz Izvještaja Međunarodne radne skupine za bolest suhog oka 2007. (engl. *International Dry Eye WorkShop, DEWS*), (preuzeto i prilagođeno prema Craig i sur., 2017, uz dopuštenje Elseviera).

1.2.2. Mogućnosti liječenja

1.2.2.1. Topikalna primjena

Topikalna primjena lijekova najčešća je metoda liječenja stanja povezanih s prednjim dijelom oka, pogotovo zbog toga što je povezana sa smanjenim rizikom od komplikacija i lakoćom primjene kod kuće od strane samih pacijenata. Ipak, bioraspoloživost lijekova nakon topikalne primjene vrlo je mala – prosječna bioraspoloživost lijeka u ciljnim tkivima manja je od 5% primijenjene doze (Dave i sur., 2021; Vaneev i sur., 2021; Tsai i sur., 2018; Bachu i sur., 2018). Razlog male bioraspoloživosti posljedica je dinamike površine oka, koja uključuje izmjenu suznog filma (barijera koja se sastoji od površinskog lipidnog sloja te vodenomukoznog sloja gela), treptanje (uglavnom nesvjesno zatvaranje i otvaranje oka na trenutak; www.merriam-webster.com) i nazolakrimalnu drenažu (sustav koji služi kao kanal za odvođenje suza s površine oka u nosnu šupljinu; emedicine.medscape.com).

Zbog male bioraspoloživosti, potrebno je učestalije doziranje topikalnih lijekova (više puta dnevno), a to može dovesti do niske adherencije pacijenata, pogotovo pri kroničnim stanjima. Kod starijih pacijenata i pacijenata s poremećajem vida adherencija je dodatno smanjena zbog poteškoća s primjenom u vlastito oko (Dave i sur., 2021). Na tržištu su još uvijek umjetne suze najčešći način liječenja bolesti suhog oka, a uz njih postoje i drugi ljekoviti oblici, uređaji ili nefarmakološke mjere kojima se potiče izlučivanje suza te topikalni protuupalni lijekovi (Jurišić Dukovski, 2021).

1.2.2.1.1. Kapi za oko

Velik broj topikalnih lijekova za liječenje bolesti suhog oka prisutnih na tržištu nalazi se u obliku vodenih otopina, a vrlo mali u obliku emulzija ulja u vodi (U/V emulzija). Prilikom primjene dolazi do brzog miješanja kapi za oko sa suznom tekućinom, a zbog prethodno opisane dinamike površine oka, poluvrijeme života lijeka na površini oka je od otprilike 4 minute (Awwad i sur., 2017). Iz tog razloga postoji veliko zanimanje za uočavanjem i razvojem farmaceutskih oblika koji bi osigurali dulje zadržavanje lijeka na površini oka, čime bi došlo do povećanja bioraspoloživosti lijekova dostavljenih ovim putem (Dave i sur., 2021).

1.2.2.1.2. *In situ* gelirajući sustavi

In situ gelirajući sustavi polimerne su otopine koje stvaraju hidrogel nakon kontakta s površinom oka zbog promjene u temperaturi, pH ili sastavu elektrolita. Hidrogel zadržava lijek dulje na površini oka i time mu povećava bioraspoloživost (Dave i sur., 2021; Chen i sur., 2018).

1.2.2.1.3. Nanosustavi

Tehnologija nanočestica ima potencijal omogućiti olakšanu dostavu lijeka u oko jer se razvijaju nanosustavi temeljeni na mukoadheziji i mukopenetraciji kako bi se lijek mogao dulje zadržati na površini oka, a apsorpcija lijeka u oko poboljšati. Nanočestice usmjerene na liječenje bolesti prednjeg dijela oka često su dizajnirane da budu mukoadhezivne, to jest da stupaju u kontakt s mucinima na površini oka i tako omogućuju dulje vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka, a time i veću bioraspoloživost (Dave i sur., 2021).

1.3. Nanoemulzije

1.3.1. Nanoemulzije – osnove i podjela

Nanoemulzije (NE) polutransparentni su do mliječno bijeli i termodinamički nestabilni, ali kinetički stabilni sustavi s rasponom veličine kapljica unutarnje faze od 20 do 500 nm (Singh i sur., 2020; Rimple i Newton, 2018). U NE spadaju disperzije vode u ulju (V/U) ili ulja u vodi (U/V); dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, stabilizirane odgovarajućim površinski aktivnim tvarima (Singh i sur., 2020; Singh i sur., 2017). NE se u te glavne dvije kategorije svrstavaju na temelju dispergirane faze, tj. unutarnje faze. Tako U/V NE čini vanjska vodena faza u kojoj su dispergirane uljne kapljice, a V/U NE vanjska uljna faza u kojoj su dispergirane vodene kapljice (Singh i sur., 2020).

U/V NE privukle su značajniju pažnju znanstvenika koji se bave razvojem farmaceutskih oblika za oftalmičku primjenu jer vodena vanjska faza omogućuje jednostavno razrjeđivanje sa suznom tekućinom, a u kapljice unutarnje uljne faze mogu se uklopiti lipofilni lijekovi čime im se može produljiti vrijeme zadržavanja na površini oka, a što sve rezultira većom bioraspoloživostu lijeka (Singh i sur., 2020).

1.3.2. Karakteristike nanoemulzija

Fizičko-kemijski parametri NE imaju značajan utjecaj na bioraspoloživost lijeka. Ti parametri uključuju veličinu, raspodjelu veličina i zeta-potencijal kapljica unutarnje faze, profil viskoznosti kao funkciju primijenjene sile smicanja, površinsku napetost, pH i osmolarnost (Choi i Lionberger, 2016). Ovi parametri ovise o proizvodnom procesu i mogu se razlikovati, čak i kad NE imaju jednak kvalitativan i kvantitativan sastav (Qu i sur., 2018; Rahman i sur., 2014).

Točno određivanje veličine i raspodjele veličina kapljica nužno je za razumijevanje svojstava kao što su brzina oslobađanja i apsorpcija djelatne tvari (Gaumet i sur., 2008). Iako mnoge tehnike mogu biti korištene u ovu svrhu, nužno je razumjeti prednosti i nedostatke svake od njih te sukladno potrebama donijeti pravu odluku. Tako je na primjer laserska svjetlosna difrakcija često korištena tehnika za karakterizaciju veličine kapljica u aerosolima, suspenzijama i emulzijama; donja granica detekcije većine takvih uređaja je oko 0,02 μm , a raspon mjerenja je do 2000 μm (Rawal i Patel, 2018). Metoda dinamičkog raspršenja svjetla (engl. *dynamic light scattering*, DLS), koja ima raspon mjerenja od 0,5 nm do nekoliko mikrona, prikladnija je tehnika za nanoemulzijske sustave u odnosu na lasersku difrakciju. Polidisperznost NE može se odrediti DLS-om, no moć razlučivanja ove tehnike trebala bi biti procijenjena pri karakterizaciji vrlo polidisperznih uzoraka. Zato je potrebno razviti naprednu metodu visoke rezolucije koja će razlučiti čestice različitih veličina, oblika i/ili svojstava površine uzorka, a iz svih prikupljenih podataka pružiti detaljnu informaciju o fizičko-kemijskim svojstvima uzorka (Qu i sur., 2018).

Literaturnim pregledom nekoliko istraživanja sažeti su rezultati koji ukazuju kako vrijeme zadržavanja na površini oka može biti povećano viskoznošću, što bi rezultiralo povećanjem bioraspoloživosti (Qu i sur., 2018; Zignani i sur., 1995).

Odvodnja lijeka kroz nazolakrimalni kanal može biti pod utjecajem površinske napetosti, a to također može utjecati na vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka. Ukoliko je pH izvan

uobičajenog raspona prekornealnog suznog filma, formulacija može imati iritacijski učinak, a pH utječe i na topljivost lijeka, stabilnost formulacije i permeabilnost epitela rožnice. Na permeabilnost epitela rožnice mogu utjecati osmolarnost te površinska napetost formulacije, što može utjecati na bioraspoloživost. Stabilnost NE pod značajnim je utjecajem zeta-potencijala (Qu i sur., 2018).

1.4. Mukoadhezivnost

Tijekom 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća porastao je interes farmaceutske industrije za mukoadhezivnim farmaceutskim oblicima. Takvi farmaceutski oblici, produljujući zadržavanje lijeka na sluznici, poboljšavaju bioraspoloživost lijeka, a time i njegov terapijski učinak. Fenomen mukoadhezije smatra se posljedicom dviju faza; kontakta između mukoadhezivnog materijala i biološkog materijala (sposobnost materijala da se proširi po biološkom supstratu i sile na granici površina imaju glavnu ulogu u ovoj fazi) te faze konsolidacije, gdje nastaju fizičke i kemijske veze između mukoadhezivnog materijala i sluznice. Kod polimernih materijala ovoj fazi prethodi ispreplitanje polimernih lanaca i mucinskih glikoproteina, koji su glavne komponente sluznice. Tijekom faze konsolidacije dolazi do ojačanja mukoadhezivne granične površine – kao da je sloj sluzi stopljen s mukoadhezivnim materijalom (Rossi i sur., 2018).

Među različitim metodama za procjenu mukoadhezivnih svojstava polimera, kao novitet je 90-ih godina predstavljeno istraživanje varijacije reoloških svojstava otopine polimera nakon miješanja s otopinom/disperzijom mucina u svrhu mjerenja jakosti mukoadhezivne veze (Rossi i sur., 2018).

1.5. Kationske nanoemulzije u liječenju bolesti suhog oka

1.5.1. Posebnosti kationskih nanoemulzija

Mukoadhezivnost pri uporabi kationskih polimera primarno se pripisuje elektrostatskim interakcijama između kationskog polimera i anionskih završetaka sijalinske kiseline mucina; ipak, vodikove veze te ispreplitanje polimernih lanaca također mogu doprinijeti

mukoadhezivnim svojstvima takvih polimera. Polimeri su najčešće kationski kad sadrže amino skupine, slabe baze, što omogućuje da je većina funkcionalnih skupina i dalje protonirana u suznom filmu kako bi mogle nastati elektrostatične interakcije s mucinom (Dave i sur., 2021).

S obzirom na to da se suzni film sastoji od lipidnog sloja i vodenomukoznog sloja gela, a lipidni sloj ima važnu ulogu u stabilizaciji suznog filma, noviji oblici kapi za oko pripremljeni kao kationske NE umjetne su suze koje sadrže lipide. Novorazvijena tehnologija nazvana je Novasorb® (Daull i sur., 2017). Naime, dokazano je da deblji lipidni sloj osigurava veću stabilnost suznog filma, dok se tanji i heterogeniji lipidni sloj povezuje s manjom stabilnošću suznog filma. Lipidni sloj sastoji se većinom od nepolarnih lipida (>90-92%) i čak do 8% amfifilnih polarnih lipida {6% fosfolipidi, 1,8% sfingolipidi i 3% (O-acil)- ω -hidroksimasne kiseline [engl. (*O-acyl*)- ω -hydroxy fatty acids, OAHFAs]}, koje uglavnom imaju ulogu površinski aktivnih tvari. Više od 93% lipida lipidnog sloja suznog filma (svi nepolarni lipidi i OAHFA-e) izlučuju se iz Meibomovih žlijezda, stoga poremećaji u njihovom radu za posljedice imaju kvalitativne i kvantitativne promjene lipidnog sloja te razvoj bolesti suhog oka. Iz tog je razloga važno nadomjestiti gubitak nepolarnih i polarnih lipida zamijećen kod pacijenata s bolešću suhog oka kako bi se postigla dovoljna debljina i stabilnost lipidnog sloja suznog filma (Daull i sur., 2020). Kvantitativni sastav zdravog suznog filma i kationskih emulzija prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kvantitativni sastav zdravog suznog filma i odobrenih kationskih nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno prema Daull i sur., 2020, uz dopuštenje Mary Ann Liebert, Inc.).

	Zdravi suzni film	Kationske nanoemulzije
Struktura suznog filma	Sastav	Sastav
Lipidni sloj (0,015-0,160 μm)		
Nepolarni lipidi	Voštani esteri, esteri kolesterola, TG (>90% od ukupnih lipida)	Mineralna ulja (1%) ili srednjelančani TG (2%)
Polarni lipidi	OAHFA, PC, PE, lizoPC, SM i dr. (~8% od ukupnih lipida)	CKC (0,002% - 0,005%)
Vodonomukozni sloj gela (6,5 – 9 μm)		
Voda	Voda (~98,2%)	Pročišćena voda (96% - 98%)
Serumski proteini i proteini u suzama (6 – 10 mg/mL)	Površinski aktivni lipokalin (2 mg/mL) i topljivi mucini (pomažu u prostiranju suznog filma)	Poloksamer (0,1%) Tiloksapol (0,3%) (pomaže u prostiranju suznog filma)
Metaboliti i elektroliti	Glukoza, soli mliječne kiseline i druge soli (za održavanje toniciteta: izo-osmolaran 290 - 308 mOsmol/L)	Glicerol (osmoprotektant) (1,6% - 2,25%) i NaCl (za održavanje toniciteta: 190 – 270 mOsmol/L)
Glikozilirani proteini	Transmembranski mucini	–
CKC, cetalkonijev klorid; lizoPC (engl. <i>lysophosphatidylcholines</i>), lizofosfatidilkolini; OAHFA (engl. (<i>O-acyl</i>)- ω -hydroxy fatty acid), (O-acil)- ω -hidroksimasna kiselina; PC (engl. <i>phosphatidylcholines</i>), fosfatidilkolini; PE (engl. <i>phosphatidylethanolamines</i>), fosfatidiletanolamini; SM (engl. <i>sphingomyelins</i>), sfingomijelini; TG, trigliceridi		

Kationske NE dobivene Novasorb® tehnologijom pomažu u kompenzaciji nedostatka polarnih lipida i stabiliziraju lipidni sloj zahvaljujući cetalkonijevu kloridu, (CKC-u), pozitivno nabijenoj amfifilnoj molekuli te površinski aktivnim pomoćnim tvarima poloksameru 188 i tiloksapolu (Daull i sur., 2020; Eftimov i sur., 2020). Sve je detaljno pojašnjeno u preglednom radu Daull i sur. te je prevedeno za potrebe ovog diplomskog rada. CKC se stabilno ugrađuje u

lipidni sloj suznog filma na površini uz vodenu fazu i može nadomjestiti umjereni nedostatak polarnih lipida. Pomoćni učinak poloksamera 188 i tiloksapola, dviju površinski aktivnih hidrofilnih tvari, adsorpcija je na lipidni sloj suznog filma i samo djelomično smještanje u sloj. Tako sinergistički pridonose stabilizaciji lipidnog sloja suznog filma, iako u konačnici bivaju istisnuti s njegove površine nakon nekoliko treptaja oka. Također je zanimljivo što CKC nosi pozitivan naboj, a on ima mnoge važne uloge u stabilizaciji lipidnog sloja suznog filma i njegove površine. Pomaže usmjeriti polarni lipid na površini lipidnog sloja u položaj u kojemu je pozitivni naboj polarnog lipida okrenut prema vodenoj fazi. Pomoću elektrostatskih interakcija s pozitivno nabijenim sastavnicama izloženim vodenoj fazi, negativno nabijeni topljivi proteini (mucini, lizozim) prisutni u vodenoj fazi suznog filma adsorbiraju na površinu lipidnog sloja. Vjeruje se da ovakve interakcije doprinose pozitivnom učinku CKC-a, jer adsorbirani proteini pomažu u smanjenju površinske napetosti lipidnog sloja suznog filma i dodatno poboljšavaju ukupnu stabilnost suznog filma. Osnovna fizička načela koja su bila ključna u probiru CKC-a, poloksamera 188 i tiloksapola za postizanje dugoročne stabilnosti (rok valjanosti kationskih NE od 3 godine u zatvorenom spremniku) također osiguravaju stabilizaciju lipidnog sloja suznog filma nakon primjene kationske NE na površinu oka bolesnika s bolešću suhog oka (prikazano Tablicom 2). Napolarni lipidi iz kationskih NE odabrani su zbog svoje izvrsne interakcije s dugolančanim lipidima lipidnog sloja suznog filma (mineralna ulja) ili zbog svoje sposobnosti prostiranja preko lipidnog sloja na graničnoj površini lipidnog sloja suznog filma i zraka (srednjelančani trigliceridi) kako bi se povećala debljina lipidnog sloja. Povoljna međudjelovanja lipofilnih sastavnica kationskih NE (napolarni lipidi i CKC) s meibumom (lipofilna izlučevina Meibomovih žlijezda od koje potječe lipidni sloj suznog filma (Jurišić Dukovski, 2021)) vjeruje se da olakšavaju stabilno uklapanje napolarnih lipida i CKC u lipidni sloj suznog filma, zbog čega se, u pogledu spore izmjene lipidnog sloja suznog filma očekuje produljeno vrijeme zadržavanja te bolja terapijska učinkovitost kationskih NE na površini oka. Utjecaj primjene kationske NE na lipidni sloj suznog filma moguće je uočiti jedan sat nakon primjene. Rezultat primjene je povećana debljina lipidnog sloja suznog filma kod bolesnika s bolešću suhog oka, ali i kod zdravih dobrovoljaca (Daull i sur., 2020).

Hiperosmolarnost suza može potaknuti oštećenje stanica koje za posljedicu ima apoptozu epitelnih stanica rožnice i spojnice kao i vrčastih stanica te promijenjenu proizvodnju mucina, što pak potiče nestabilnost suznog filma i dodatno povećava hiperosmolarnost. Hiperosmolarnost suza navedena je kao jedan od uzroka bolesti suhog oka te povezane upale

površine oka. Normalne vrijednosti osmolarnosti suza u zdravih ljudi kreću se u rasponu od 290 do 308 mOsmol/L. Osmolarnost suza od 308 mOsmol/L predložena je kao prag za razlikovanje bolesnika s ranim znakovima bolesti suhog oka i zdravih ljudi. Akutno smanjenje hiperosmolarnosti (kao prolazna „korekcija osmolarnosti“) može se postići korištenjem hipoosmolarnih do izoosmolarnih kapi za oko. Primjenom ovakvih kapi za oko, zbog razrjeđenja hiperosmolarnih suza, dolazi do smanjenja hiperosmolarnosti koje traje nekoliko minuta te je povezano s brзом izmjenom vodene faze suza. Vodena faza kationskih NE za primjenu u oko, koja čini 90% - 96% njihova volumena, hipoosmolarna (190 mOsmol/L) je u umjetnim suzama koje su formulirane kao kationske NE te blago hipoosmolarna do izoosmolarna (270 mOsmol/L) u kationskim NE s djelatnim tvarima ili novijim umjetnim suzama. Za osiguranje osmolarnosti u kationskim NE koristi se glicerol u udjelu 1,6% - 2,25% (Daull i sur., 2020).

Pri usporedbi umjetnih suza kao kationskih NE s Novasorb® tehnologijom s drugim komercijalno dostupnim umjetnim suzama (Systane Balance®, Optive® i Vismed®), cijeljenje rožnice ispitalo se na zdravim muškim Wistar štakorima starima 7 – 8 tjedana. Štakori su nasumično podijeljeni u 7 skupina te je svim štakorima osim onima u kontrolnoj skupini napravljena abrazija rožnice, a potom su im primjenjivane umjetne suze. Cijeljenje rožnice bilo je slično u svim ispitnim skupinama koje su primile umjetne suze, ali je u stromi rožnica štakora koji su primili umjetne suze s Novasorb® tehnologijom pronađen najmanji broj upalnih stanica (Daull i sur., 2016). Daljnjim istraživanjem identificirao se mehanizam izravnog protuupalnog učinka; CKC, osim što je nositelj pozitivnog naboja na uljnim kapljicama u NE, pokazao se i kao specifični inhibitor protein kinaze C alfa (PKC α) (Daull i sur., 2018). Primijenjen u kationskim NE, CKC ne posjeduje nijednu štetnu osobinu kraćih amonijevih spojeva benzalkonijevog klorida (BAK), već doprinosi povoljnim utjecajem na modulaciju PKC α u liječenju upale te poboljšanju procesa cijeljenja rana kod bolesnika s bolešću suhog oka, uz osnovnu mehaničku stabilizaciju lipidnog sloja suznog filma. Također, tiloksapol, pomoćna tvar prisutna u kationskim NE s Novasorb® tehnologijom, vodotopiva površinski aktivna tvar, pokazao je protuupalnu aktivnost koja bi također mogla doprinijeti učinkovitosti ovakvih umjetnih suza. Opisan je učinak tiloksapola na supresiju aktivacije nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) pri čemu u udjelu od 0,3%, kao jedina sastavnica uklopljena u vodenu fazu NE sa srednjelančanim trigliceridima, ima sposobnost smanjenja izlučivanja interleukina 6 (IL-6) i interleukina 8 (IL-8) za 21%, odnosno 50% u epitelnim stanicama rožnice (engl. *human corneal*

epithelial cells, HCE-2) stimuliranima lipopolisaharidom (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) (Daull i sur., 2018).

Tablica 2. Sažetak funkcionalnih koristi kationskih nanoemulzija na površini oka u bolesti suhog oka (preuzeto i prilagođeno prema Daull i sur., 2020, uz dopuštenje Mary Ann Liebert, Inc.).

Sastavnice kationske nanoemulzije i ključna fizička obilježja	Uloga u nanoemulziji	Funkcionalna uloga na površini oka	
		Mehanička	Dodatna farmakološka korist
Uljna faza			
Nepolarni lipidi (različita ulja)	NP	Zadebljanje lipidnog sloja suznog filma	Nema
Polarni lipidi (CKC) (amfifilna i kationska površinski aktivna tvar)	Osiguravanje pozitivnog naboja na kapljicama ulja Stabilizacija emulzije	Stabilizacija lipidnog sloja/vodene faze na površini suznog filma Povećanje elastičnosti suznog filma između treptaja Smanjenje površinske napetosti suznog filma Poticanje elektrostatskih međudjelovanja s negativno nabijenim mucinima i površinski aktivnim proteinima	PKC α inhibitor: smanjenje prodora upalnih stanica u tkiva na površini oka i poboljšanje zarastanja rana
Vodena faza			
Tiloksapol (neionska površinski aktivna tvar)	Stabilizacija nanoemulzije	Hidrofilna površinski aktivna tvar, oponaša djelovanje površinski aktivnih proteina suznog filma	NF- κ B inhibitor: smanjenje nastajanja proupalnih citokina i kemokina

Poloksamer 188 (neionska površinski aktivna tvar)	Stabilizacija nanoemulzije	Vrlo hidrofilna površinski aktivna tvar, oponaša djelovanje površinski aktivnih proteina suznog filma	Nema
Glicerol	Osmotski agens	Osmotski agens, emolijent, smanjenje trenja i zadržavanje molekula vode u stanicama (osmoprotektant)	Nema
Ključna fizička obilježja			
Viskoznost	NP	Oponaša viskoznost suza za bolje uklapanje u suzni film i bolje prostiranje na površini oka	NP
Provodljivost (ionski sastav)	<30 mS/cm, izbjegavanje gubitka naboja u nepuferiranoj nanoemulziji (poboljšanje roka valjanosti)	Mali udio iona za poboljšanje podnašanja kapi za oko (bez prisutnosti kiselih i bazičnih iona sa štetnim djelovanjem na površinu oka)	NP
Zeta-potencijal	>15 mV, poboljšanje roka valjanosti	Elektrostatska međudjelovanja s negativno nabijenim mucinima za bolje prijanjanje na površinu oka Bolje prostiranje na površini oka	NP

NP, nije primjenjivo; NF- κ B, nuklearni faktor- κ B; PKC α , protein kinaza C alfa

Osim CKC, kao nositelj pozitivnog naboja u izradi NE za liječenje suhog oka predlaže se i kitozan. Kitozan i njegovi derivati najistraživaniji su kationski polimeri koji se koriste kao mukoadhezivne tvari. Polusintetski je polimer nastao deacetilacijom bipolimera hitina koji sadrži primarne amino skupine u monosaharidima glukozaminu i N-acetilglukozaminu, a njegove su prednosti da je biokompatibilan i biorazgradiv (aktivnošću lizozima iz suzne tekućine) (Jurišić Dukovski, 2021; Alonso i Sánchez, 2010). Oligomer kitozana nastaje

hidrolizom polimera kitozana i sadrži oligosaharide β -1,4-lančanog D-glukozamina prosječne molekulske mase $< 10\ 000$ Da (Fang i sur., 2014). Zbog mehanizma elektrostatskog odbijanja kitozan može spriječiti koalescenciju kapljica, ali povećava stabilnost NE i tako što na površini kapljica stvara nepropustan film pa je usporen njihov rast mehanizmom Ostwaldovog zrenja (Jurišić Dukovski, 2021). Zahvaljujući svojstvu vezanja za mucine na epitelnim stanicama rožnice pa uslijed toga i manjoj brzini razgradnje tih mucina u sluznici oka, oligomer kitozana na površini kapljica sekundarnih kationskih NE povećava vrijeme zadržavanja pripravka na površini oka (Xu i sur., 2020). Također je dokazano da kitozan ima sposobnost otvaranja čvrstih međustaničnih spojeva, čime može pružiti svojstva poboljšanja prijenosa lijeka paracelularnim putem. Nadalje, kitozan posjeduje antimikrobna svojstva, korisnu karakteristiku u liječenju bolesti površine oka; razvoj sekundarnih bakterijskih infekcija površine oka čest je i kod bolesnika s bolešću suhog oka (de la Fuente i sur., 2010). Kitozan se u NE najčešće uklapa na način da se u prethodno pripravljenu anionsku NE (primarna NE) dodaje vodena otopina kitozana. Prisutnost pozitivnog naboja na kitozanu omogućuje mu smještanje na površinu negativno nabijenih uljnih kapljica, koje tada postaju pozitivno nabijene i tvore sekundarnu kationsku NE (Jurišić Dukovski, 2021). NE s kitozanom proizvode se i metodom ionotropnog geliranja koristeći natrijev tripolifosfat (TPP) kao umreživač (da Silva i sur., 2016). Većina terapijskih sustava temeljenih na kitozanu predstavlja mješovite sustave. Kitozan se često miješa s anionskim polimerom velike molekulske mase kao što su poliakrilna kiselina (PAA), hijaluronska kiselina (HA), sijalinska kiselina (SA), pektin i dekstran ili dekstrinski derivati. Tada odabrani anionski polimer djeluje slično TPP-u, kao ionski umreživač za kitozan, ali istovremeno omogućuje i dodatna mukoadezivna svojstva, poboljšava permeabilnost lijekova i smanjuje naglo oslobađanje lijeka (Dave i sur., 2021; Janagam i sur., 2017).

1.5.2. Primjeri odobrenih lijekova temeljenih na tehnologiji nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka

Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 2003. godine odobrila je lijek zaštićenog naziva Restasis® (Allergan, Irvine, Kalifornija, SAD) za liječenje bolesti suhog oka. To je U/V NE s ciklosporinom A (0,05%, *m/m*), a propisuje se pacijentima kako bi se povećala proizvodnja suza pri kroničnom stanju suhog oka zbog upale površine oka. Ciklosporin A ima djelovanje specifično usmjereno na T-limfocite – sprječava

njihovu aktivaciju i lučenje proupalnih citokina te nastanak upale. Dodatno, povećava izlučivanje suza, smanjuje hiperosmolarnost suznog filma, sprječava apoptozu stanica te povećava broj i gustoću vrčastih stanica u spojnici oka (Jurišić Dukovski, 2021; Walenga i sur., 2019). Osim ciklosporina A kao djelatne tvari, pripravak sadrži kao pomoćne tvari glicerol, ricinusovo ulje, polisorbit 80, tip A kopolimer karbomera, pročišćenu vodu te natrijev hidroksid (za podešavanje pH). Kad NE stupi u kontakt sa suznim filmom, uljna faza se veže za lipidni sloj suznog filma, a površinski aktivne tvari spajaju se s vodenomukoznim slojem gela. Djelatna tvar – ciklosporin A – može biti prisutna u vodenoj, uljnoj ili micelarnoj fazi. Ovaj lijek Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) nije odobrila, ali je u veljači 2022. godine u SAD-u FDA odobrila prvi generički lijek s 0,05% (*m/m*) ciklosporina A, na zahtjev tvrtke Mylan Pharmaceuticals Inc. (Walenga i sur., 2019; Qu i sur., 2018; accessdata.fda.gov; fda.gov).

Kationska NE s ciklosporinom A (0,1%, *m/V*) pod zaštićenim nazivom Ikervis® (Santen SAS, Evry, Francuska) odobrena je u Europskom gospodarskom prostoru (engl. *European Economy Area*, EEA) 2015. godine za liječenje ozbiljnog keratitisa kod pacijenata s bolešću suhog oka kojima se stanje nije popravilo usprkos korištenju umjetnih suza. Od pomoćnih tvari sadrži srednjelančane trigliceride, CKC, glicerol, poloksamer 188, vodu za injekcije te natrijev hidroksid (za podešavanje pH). Ova kationska NE povećava bioraspoloživost ciklosporina A u odnosu na prethodno dostupne pripravke s ciklosporinom A (Jurišić Dukovski 2021, Pisella i sur., 2018; ema.europa.eu). Restasis® je anionska NE ciklosporina A koja je pokazala dobro svojstvo penetracije u oko bez značajne sistemske apsorpcije. Farmakokinetička ispitivanja osmišljena za procjenu okularne i sistemske distribucije ciklosporina A nakon jednokratnog i višestrukog doziranja kationske NE (kao što je Ikervis®), u usporedbi s Restasis®-om kao referentnom formulacijom, potvrđuju prednost pozitivno nabijenih kapljica u poboljšanju penetracije ciklosporina A u oko (Lallemand i sur., 2012).

Na tržištu SAD-a i Europe prisutan je i bezreceptni lijek Cationorm® (Santen SAS, Evry, Francuska) koji je također kationska NE pripravljena Novasorb® tehnologijom, ali ne sadrži djelatnu tvar. Pripravak je NE za ovlaživanje i podmazivanje koja štiti površinu oka te olakšava neugodu i nadražaj suhog oka zbog duge uporabe kontaktnih leća ili okolišnih čimbenika. Cationorm® je kompatibilan sa svim tipovima kontaktnih leća (Garrigue i sur., 2017; ndrugs.com).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U/V kationske NE bez djelatne tvari predstavljaju rješenje za blagi oblik bolesti suhog oka na način da povećavaju debljinu lipidnog sloja suznog filma te umanjuju simptome bolesti suhog oka s većom učinkovitošću u odnosu na umjetne suze bez lipida (Weisenberger i sur., 2021). Nadalje, dobra su tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih protuupalnih lijekova kojima omogućuju produljeno zadržavanje na površini oka, a istodobno pružaju nadoknadu i stabilizaciju suznog filma čija je struktura narušena (Jurišić Dukovski, 2021). Stoga kationske NE predstavljaju napredak u liječenju težeg oblika bolesti suhog oka, ali i općenito u oftalmičkoj primjeni.

U diplomskom radu istražuju se kationske NE gdje se kitozan (biokompatibilni i biorazgradivi polusintetski kationski polimer) smješta na površinu negativno nabijenih kapljica disperzne faze i daje im pozitivan naboj. Pozitivan naboj na površini uljnih kapljica utječe na sposobnost vezanja sustava za površinu oka bogatu mucinima, negativno nabijenim glikoproteinima (fenomen mukoadhezije). Osim toga, zbog pozitivnog naboja na površini kapljica i mehanizma elektrostatskog odbijanja, kitozan može povećati stabilnost NE; ujedno stvara i nepropustan film zbog čega je usporen rast kapljica Ostwaldovim zrenjem. Dodatna pogodnost kitozana je i ta što ima antimikrobna svojstva, što je od velike koristi u liječenju površine oka. U liječenju bolesti suhog oka antimikrobna su svojstva kitozana poželjna jer se često javljaju sekundarne bakterijske infekcije (de la Fuente i sur., 2010).

Oligomer kitozana hidrolizat je kitozana odnosno oligosaharida β -1,4-lanaca D-glukozamina s prosječnom molekulskom masom $< 10\ 000$ Da (Fang i sur., 2014). S obzirom na manju molekulsku masu oligomera kitozana u odnosu na polimer, cilj diplomskog rada je bio ispitati fizičko-kemijska svojstva i mukoadhezivnost sekundarne kationske NE s oligomerom kitozana u usporedbi sa sekundarnim kationskim NE s polimerom kitozana male molekulske mase razvijenima u prethodnim istraživanjima na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

- Pripraviti sekundarne kationske U/V NE s oligomerom kitozana visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije;
- Ispitati utjecaj oligomernog kitozana na veličinu kapljica, indeks polidisperznosti i zeta-potencijal pripremljenih NE;

- Ispitati utjecaj oligomernog kitozana na mukoadhezivnost pripremljenih NE.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za pripravu NE korišteno je sintetsko ulje Miglyol® 812 (Fagron, Donja Zelina, Hrvatska). Površinski aktivne tvari koje su bile korištene su: Kolliphor EL® (BASF, Ludwigshafen, Njemačka) i lecitin (Lipoid S 45, Lipoid, Ludwigshafen, Njemačka). Korišteni nosači pozitivnog naboja bili su kitozan male molekulske mase (50-190 kDa; stupnja deacetilacije 75-85%; viskoznosti 20-300 mPas – 1%-tna otopina u 1%-tnoj octenoj kiselini, pri 25°C; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) te oligo-kitozanlaktat (molekulske mase 4-6 kDa; stupnja deacetilacije >90%; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka). Korišteno sredstvo za izotonizaciju bio je glicerol (Fagron, Donja Zelina, Hrvatska). Mucin koji je korišten bio je mucin iz želudca svinje (Tip III, s 0,5 – 1,5 % vezane sijalinske kiseline, djelomično pročišćeni prašak, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Sjedinjene Američke Države). Simulirana suzna tekućina (engl. *Simulated Tear Fluid*, STF) pripravljena je otapanjem NaCl (6,8 mg mL⁻¹), NaHCO₃ (2,2 mg mL⁻¹), KCl (1,4 mg mL⁻¹) i CaCl₂ × 2H₂O (0,08 mg mL⁻¹) u vodi; pH vrijednost STF bila je 7,4. U istraživanju je bila korištena pročišćena voda (SG, Günzburg, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Priprava nanoemulzija

3.2.1.1. Priprava vodene otopine kitozana male molekulske mase

Kitozan male molekulske mase (1%, *m/m*) otopljen je u pročišćenoj vodi kojoj je prethodno dodana ledena octena kiselina (Alkaloid AD Skopje, Skopje, Republika Sjeverna Makedonija) (0,5%, *m/m*). Za otapanje je bilo potrebno sat vremena na magnetnoj miješalici (FagronLab TM PRO-DMS, Fagron, Donja Zelina, Hrvatska) pri 1200 okr/min i sobnoj temperaturi. Otopina je filtrirana preko standardnog filter-papira.

3.2.1.2. Priprava uljne faze

Lecitin je otopljen u Miglyolu 812 u omjeru 1:50 (*m/m*) na multikanalnoj magnetnoj miješalici (2Mag Magnetic Motion 15 eco, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), pri sobnoj temperaturi.

3.2.1.3. Priprava grubih emulzija

Gruba emulzija bez kitozana pripravljena je otapanjem Kolliphor EL-a (0,25%, *m/m*) u vodi, uz miješanje na multikanalnoj magnetnoj miješalici pri 700 okr/min i sobnoj temperaturi, a zatim je dodan glicerol (2,5%, *m/m*) uz nastavak miješanja. U konačnici je dodana uljna faza pripravljena na navedeni način (odjeljak 3.2.1.2.) u udjelu 2,55%, *m/m*. Gruba emulzija je prvotno miješana na multikanalnoj magnetnoj miješalici, a zatim i pomoću visokoturažne miješalice (Ultra-Turrax®, IKA-Werke GmbH & Company, Staufen, Njemačka) pri brzini od 15 000 okr/min tijekom 5 minuta. Gruba emulzija, kojoj je kitozan dodan tek nakon obrade na mikrofluidizatoru, pripravljena je na identičan način kao prethodna, samo u dvostrukim udjelima Kolliphor EL-a, glicerola i uljne faze. Gruba emulzija s kitozansom male molekulske

mase (0,05%, *m/m*) pripremljena je na isti način kao i gruba emulzija bez kitozana, uz dodavanje vodene otopine kitozana male molekulske mase (pripravljene kao što je navedeno u odjeljku 3.2.1.1.) u udjelu od 5%, *m/m*. Gruba emulzija s oligo-kitozanlaktatom (0,05%, *m/m*) pripravljena je na jednak način kao i gruba emulzija s kitozanom male molekulske mase, a 1% (*m/m*) otopina oligo-kitozanlaktata dobivena je otapanjem suhe tvari oligo-kitozanlaktat (1%, *m/m*) u pročišćenoj vodi.

3.2.1.4. Obrada grubih emulzija na mikrofluidizatoru

Pripravljene grube emulzije iz odjeljka 3.2.1.3. obrađene su na mikrofluidizatoru (LM20 Microfluidizer® High Shear Fluid Processor, Microfluidics, Newton, Massachusetts, SAD) pri 1000 bara, u 5 ciklusa te su čuvane na +4°C do sljedećeg dana.

3.2.1.5. Priprava nanoemulzija naknadnim dodatkom otopina kitozana

Pripravljenim NE s dvostrukim udjelima Kolliphor EL-a (0,05%, *m/m*), glicerola (5%, *m/m*) i uljne faze (5,1%, *m/m*) dodana je vodena otopina kitozana male molekulske mase (1%, *m/m*), pripravljena kako je navedeno u odjeljku 3.2.1.1. te vodena otopina oligo-kitozanlaktata (1 %, *m/m*). Zatim su NE razrijeđene dodatkom pročišćene vode tako da se početni udio Kolliphor EL-a, glicerola i uljne faze prepolovio, a konačni udio kitozana male molekulske mase odnosno oligo-kitozanlaktata iznosio je 0,05% (*m/m*). NE su potom miješane 20 minuta na multikanalnoj magnetnoj miješalici pri 800 okr/min.

3.2.2. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija

3.2.2.1. Mjerenje veličine kapljica, raspodjele veličina kapljica i zeta-potencijala

Veličina kapljica te indeks polidisperznosti – PDI NE mjereni su pomoću dinamičkog raspršivanja svjetlosti, a zeta-potencijal mjeran je pomoću elektroforetskog raspršivanja svjetlosti na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) pri 25°C. Mjerenje veličine kapljica i PDI vršeno je pod kutovima detekcije od 90° i 174,7°; mjeran je čisti uzorak te uzorci razrijeđeni 50, 100 i 500 puta (svi u triplikatu) pročišćenom vodom. Mjerenje zeta-potencijala vršeno je pod kutom detekcije od 174,7°; mjeran je čisti uzorak te uzorci razrijeđeni 50, 100 i 500 puta, u triplikatu, u 10 mM otopini NaCl-a te u 2,5%-tnoj otopini glicerola.

3.2.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija

3.2.3.1. Priprava 20%, *m/m* disperzije mucina u simuliranoj suznoj tekućini

Disperzija mucina (20%, *m/m*) u STF pripravljena je na magnetnoj miješalici miješanjem tijekom noći na sobnoj temperaturi.

3.2.3.2. Priprava 10%, *m/m* disperzije mucina u simuliranoj suznoj tekućini te razrjeđenja nanoemulzija s disperzijom mucina (20%, *m/m*) u simuliranoj suznoj tekućini u omjeru 1:1

Disperzija mucina (10%, *m/m*) u STF-u pripravljena je razrjeđivanjem disperzije mucina (20%, *m/m*) u STF-u s pročišćenom vodom u omjeru 1:1 (*m/m*). NE bez kitozana te s kitozanom male molekulske mase i oligo-kitozanom također su u omjeru 1:1 (*m/m*) razrijeđene disperzijom

mucina (20%, *m/m*) u STF-u. Disperzije su potom miješane na multikanalnoj magnetnoj miješalici tijekom 15 minuta pri brzini miješanja od 750 okr/min na sobnoj temperaturi.

3.2.3.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija reološkom metodom

Mukoadhezivna svojstva prethodno pripremljenih uzoraka reološkom su metodom ispitivana rotacijskim testom pomoću reometra MCR 102 (Anton Paar, Graz, Austrija) s mjernim tijelom CP (engl. *cone-plate*) 50-1, promjera 50 mm, nagiba 1°, a razmak između gornjeg i donjeg mjernog tijela bio je 0,102 mm. Krivulje viskoznosti mjerenih uzoraka dobivene su ovom metodom pri brzini smicanja 1-100 s⁻¹ i temperaturi od 34°C. Vrijednosti viskoznosti izmjerene pri 100 s⁻¹ poslužile su za izračun komponente viskoznosti uzrokovane bioadhezijom (η_b), a ona je izračunata prema izrazu:

$$\eta_b = \eta_{n+m} - \eta_n - \eta_m$$

pri čemu je η_{n+m} viskoznost NE pomiješane s disperzijom mucina, η_m viskoznost disperzije mucina (10 %, *m/m*), dok je η_n viskoznost NE pomiješane sa STF-om. Sva su mjerenja provedena u triplikatu. NE u koje je kitozan dodan nakon mikrofluidizacije grubih emulzija nisu bile uključene u ovo ispitivanje.

3.2.3.4. Priprava disperzije mucina (1%, *m/m*) u simuliranoj suznoj tekućini

Disperzija mucina (1%, *m/m*) u STF pripravljena je na način koji je opisan u odjeljku 3.2.3.1.

3.2.3.5. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala

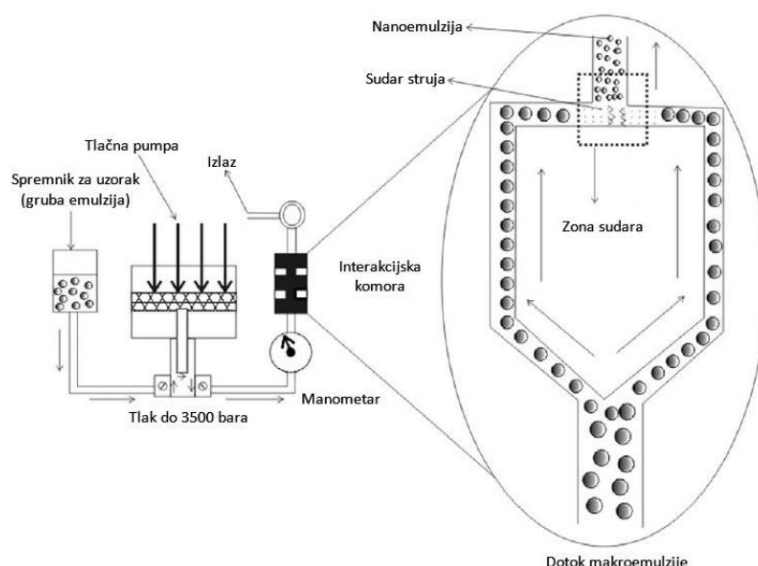
NE bez kitozana te nanoemulzije s kitozonom male molekulske mase i oligo-kitozonom pomiješane su s pripremljenom disperzijom mucina (1%, *m/m*) u STF-u u omjeru 40:7 (*V/V*), miješane su na multikanalnoj magnetnoj miješalici tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi pri brzini miješanja od 300 okr/min. U 0., 5. i 20. minuti uzeti su uzorci za mjerenje veličine kapljica, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala. Prije mjerenja, uzorci su razrijeđeni 100 × (*V/V*), a sva su mjerenja vršena u triplikatu. Mjerenja su vršena na uređaju Zetasizer-Ultra pri temperaturi od 25°C, pod kutom detekcije od 174,7°, pri čemu je uređaj svakom uzorku unutar jednog mjerenja izmjerio sva tri mjerena svojstva. NE u koje je kitozan dodan nakon mikrofluidizacije grubih emulzija nisu bile uključene u ovo ispitivanje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sekundarne kationske nanoemulzije s oligomerom kitozana

Sekundarne kationske NE s kitozanom mogu se pripremiti uz pomoć mikrofluidizatora, uređaja koji koristi visoke tlakove kako bi proizveo dovoljno snažne sile za smanjenje veličine kapljica do veličina karakterističnih za NE. Gruba emulzija pod visokim se tlakom propušta kroz mikrokanaliće interakcijske komore gdje, zbog sudara struja formulacije usmjerenih jedne prema drugoj te rezultirajućeg smičnog naprezanja dolazi do smanjenja veličine kapljica unutarnje faze. Kako bi se postigli optimalni rezultati procesa mikrofluidizacije, potrebno je propustiti formulaciju kroz mikrofluidizator nekoliko puta (Jurišić Dukovski, 2021). Mikrofluidizacijom gotovo svako ulje može biti podvrgnuto procesu pripreme NE, a moguće je jednostavno povećanje proizvodnje NE na industrijsko mjerilo. Princip rada mikrofluidizatora prikazan je slikom 2.

Mikrofluidizacija se svrstava u visokoenergetske metode, što podrazumijeva ulaganje velike količine energije za usitnjavanje uzorka. Uz mikrofluidizaciju takve su i metoda ultrasonikacije (homogenizacija uzorka pomoću ultrazvučne sonde) te metoda visokotlačne homogenizacije (Singh i sur., 2017). Princip rada visokotlačnog homogenizatora sličan je principu rada mikrofluidizatora, to jest, temelji se na korištenju visokih tlakova i jakih sila kako bi nastale usitnjene kapljice unutarnje faze (Jurišić Dukovski, 2021).



Slika 2. Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., 2017, uz dopuštenje Elseviera).

Sekundarne kationske NE s kitozonom mogu se pripraviti na dva načina vezano uz redosljed dodatka kitozana. Jedan način podrazumijeva dodatak kitozana u već pripremljenu anionsku NE (Jurišić Dukovski i sur., 2020), a drugi dodatak otopine kitozana u vodenu fazu prije obrade formulacije na mikrofluidizatoru (Jurišić Dukovski i sur., 2020). Pokazalo se prikladnijim i jednostavnijim pripraviti NE drugim opisanom načinom (Jurišić Dukovski, 2021).

U diplomskom radu kao uljna faza odabrano je polusintetsko ulje Miglyol® 812, smjesa srednjelančanih triglicerida (55%, *m/m* kaprilna kiselina i 45%, *m/m* kaprinska kiselina) (Sheskey i sur., 2017). Kao anionska površinski aktivna tvar u svim NE odabran je lecitin Lipoid® S45. Kao neionska površinski aktivna tvar odabran je Kolliphor® EL. Kao oligomer kitozana odabran je oligo-kitozanlaktat, kationski oligomer u obliku soli mliječne kiseline molekulske mase od 4 do 6 kDa te stupnja deacetilacije >90%. Za usporedbu sekundarnih kationskih NE s oligomerom kitozana korišten je kitozan male molekulske mase od 50 do 190 kDa te stupnja deacetilacije 75-85%. Kitozan kao polisaharid ili oligosaharid glukozamina i N-acetilglukozamina pri pH nižem od 6 pozitivno je nabijen zbog protonacije amino skupina glukozamina. Glicerol je odabran kao sredstvo za izotonizaciju, a vodenu fazu predstavljala je pročišćena voda.

Lipoid® S45 anionska je površinski aktivna tvar izolirana iz sjemena soje, koja se sastoji 45-50% (*m/m*) od fosfatidilkolina, 10-18% (*m/m*) fosfatidiletanolamina, najviše 4% lizofosfatidilkolina, uobičajenog sastava masnih kiselina: 58-65% (*m/m*) linolna kiselina, 12-17% (*m/m*) palmitinska kiselina, 8-12% (*m/m*) oleinska kiselina i ostale masne kiseline. S

obzirom na prisutnost fosfolipida u staničnim membranama ljudskih stanica, lecitini su jedni od najsigurnijih površinski aktivnih tvari. Fosfolipidi iz korištenog lecitina također su prisutni i u suznom filmu, a u suznom filmu bolesnika s bolešću suhog oka udio fosfatidiletanolamina (smatra se ključnim za stabilizaciju suznog filma) značajno je manji. Lecitin ukupnog negativnog naboja potreban je kako bi se osigurao negativan naboj na površini uljnih kapljica NE, što bi omogućilo vezanje pozitivno nabijenog kitozana na površinu kapljica i mukoadhezivnost pripravljene formulacije. Naboj molekula fosfolipida u odabranom lecitinu je nula, a nositelji negativnog naboja koji karakterizira lecitin slobodne su masne kiseline – ovdje je najzastupljenija linolna kiselina. Zbog dobre kompatibilnosti lecitina s površinom oka bilo je potrebno sastavnice NE prilagoditi tako da budu kompatibilne s lecitinom. Iz tog je razloga odabran Miglyol® 812 kao uljna faza za pripravu NE jer je lecitin u njemu dobro topljiv pri sobnoj temperaturi (Jurišić Dukovski, 2021).

Kolliphor® EL, makrogolglicerol ricinoleat 35, neionski je solubilizator i emulgator dobiven reakcijom ricinusova ulja s etilen oksidom u molarnom omjeru 1:35. Uljasta je tekućina blijedo žute boje, bistra na temperaturama iznad 26°C. S vodom tvori bistru otopinu, a topljiv je i u mnogo organskih otapala, npr. etilni alkohol, etil-etanoat, kloroform (Sheskey i sur., 2017). HLB vrijednost mu je 12-14, stoga je prikladan za izradu U/V NE. U pripravi NE korišten je kao sekundarna neionska površinski aktivna tvar jer je poznato da se stabilnost NE s lecitinom može povećati dodatkom hidrofilnije površinski aktivne tvari koja je zaslužna za dodatno smanjenje veličine kapljica (Jurišić Dukovski, 2021).

Osim male veličine kapljica i PDI, primarna anionska NE trebala je zadovoljavati vrijednosti zeta-potencijala koje su dovoljno negativne kako bi kapljice bilo moguće obložiti molekulama kitozana i pripremiti sekundarnu kationsku NE (Jurišić Dukovski, 2021).

Glicerol, propan-1,2,3-triol, molekula je neutralnog naboja i zbog toga što nema utjecaj na naboj NE, prikladan je za izotonizaciju sekundarnih kationskih NE. Također, posjeduje i kratkotrajan osmoprotektivni učinak, što može smanjiti oštećenje epitelnih stanica površine oka kod bolesnika s bolešću suhog oka uzrokovano hiperosmotskim stresom (Jurišić Dukovski, 2021).

Pripravljene NE u konačnici su imale sastav: 2,5% (*m/m*) Miglyol® 812, 0,05% (*m/m*) lecitin, 0,25% (*m/m*) Kolliphor® EL, 0,05% (*m/m*) kitozan, 2,5% (*m/m*) glicerol i pročišćena voda do 100% (*m/m*).

4.2. Izrada nanoemulzija

Nakon odabira sastavnica NE, pripravljene su grube emulzije koje su zatim podvrgnute postupku mikrofluidizacije pri 1000 bara u 5 uzastopnih ciklusa s ciljem pripreve NE. Pripravljeno je po 3 uzorka za svaku vrstu NE: primarna anionska nanoemulzija (N), sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana u koju je oligomer dodan prije procesa mikrofluidizacije (NC oligo), sekundarna kationska nanoemulzija s kitozonom male molekulske mase u koju je polimer dodan prije procesa mikrofluidizacije (NC LMW), sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana u koju je oligomer dodan nakon procesa mikrofluidizacije (N+C oligo) te sekundarna kationska nanoemulzija s kitozonom u koju je polimer dodan nakon procesa mikrofluidizacije (N+C LMW) (ukupno 15 NE). Češće zastupljeni postupak pripreve sekundarnih kationskih NE s kitozonom karakterizira dodavanje otopine kitozana u gotovu primarnu anionsku NE. Ovakav postupak zahtijeva dodatan korak u pripravi, što rezultira povećanjem složenosti pripreve te povećanjem mogućnosti pogreške i kontaminacije. Zbog svega toga proces je manje prikladan za uvećanje na industrijsko mjerilo (Jurišić Dukovski, 2021). Priprava stabilnih sekundarnih kationskih NE s kitozonom na način da se otopina kitozana dodaje u vodenu fazu prije miješanja uljne i vodene faze, obrade na visokoturažnoj miješalici i mikrofluidizatoru skraćuje proizvodni proces i može olakšati njegovo uvećanje na industrijsko mjerilo.

4.2.1. Veličina kapljica unutarnje faze i indeks polidisperznosti

Osnovna fizičko-kemijska karakterizacija NE obuhvaća određivanje prosječne veličine kapljica unutarnje faze, raspodjelu veličina te zeta-potencijal kapljica unutarnje faze. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti (mjera rasapa veličina kapljica NE oko prosječne vrijednosti) izmjereni su nerazrijeđenim i serijski razrijeđenim NE metodom dinamičkog raspršivanja svjetlosti korištenjem Zetasizer Ultra uređaja, istovremeno na 2 kuta detekcije 174,7° i 90°. Pristupilo se razrjeđivanju NE kako bi se osigurala pouzdana i točna mjerenja. Svaki uzorak ima svoj idealan raspon koncentracije za optimalna mjerenja (“Zetasizer Advance Series User guide,” 2022). Ako je koncentracija uzorka premala, intenzitet raspršene svjetlosti nije dovoljan za analizu. Ako je uzorak prekoncentriran, tada će se svjetlost raspršena jednom česticom sama

na putu do detektora raspršiti na drugim česticama čime joj se smanjuje intenzitet (višestruko raspršenje). Gornja granica koncentracije također je određena točkom u kojoj čestice zbog međusobnih interakcija ne mogu slobodno difundirati. Kad god je to moguće, koncentraciju uzorka treba odabrati tako da uzorak ima blago mliječni izgled. Za čestice u rasponu veličine od 100 nm do 1 μ m preporučeno je maksimalni maseni udio od 1%.

Uređaj Zetasizer Ultra omogućuje višestruko dinamičko raspršenje svjetlosti (Multi-angle Dynamic Light Scattering, MADLS®) odnosno mjerenje raspršenja svjetlosti pod tri kuta detekcije, 174,7, 90 ili 12,78° (“Zetasizer Advance Series User guide,” 2022). Čestice različite veličine raspršuju više ili manje svjetlosti pod različitim kutovima zbog interakcije između valne duljine osvjetljenja i veličine čestica. Metoda višestrukog dinamičkog raspršenja svjetlosti osigurava određivanje raspodjele veličina čestica s većom razlučivošću.

Rezultati određivanja prosječne veličine kapljica unutarnje faze i indeksa polidisperznosti prikazani su tablicom 3 za kut detekcije od 90° te tablicom 4 za kut detekcije od 174,7°.

S obzirom na to da su NE s kitozonom male molekulske mase razvijene u okviru prethodnih istraživanja na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju bile mjerene pri kutu detekcije od 90°, ovdje je radi usporedbe također pristupljeno mjerenju formulacija pri navedenom kutu detekcije. Zbog postavki uređaja, mjerenje dinamičkog raspršenja svjetlosti pri kutu detekcije od 90° moguće je u okviru mjerenja višestrukog dinamičkog raspršenja svjetlosti.

Rezultati mjerenja veličine kapljica i PDI NE bez kitozana usporedivi su s rezultatima iz prethodnih istraživanja. Vrijednost veličine kapljica anionske NE bila je 181,1 nm, a PDI 0,092 (Jurišić Dukovski, 2021). Zbog veće koncentracije nerazrijeđenih uzoraka, uređaj Zetasizer Ultra pri mjerenju opcijom MADLS® nije mjerio veličinu kapljica i PDI u središtu kivete, stoga rezultati tih mjerenja nisu ni prikazani jer nisu bili pouzdani. Pri mjerenju uzoraka niske koncentracije ili uzoraka s malom veličinom kapljica korisno je povećati količinu raspršenja svjetlosti. Stijenka mjerne kivete također može raspršiti dio svjetlosti što predstavlja značajnu smetnju u mjerenju ovakvih tipova uzoraka. Pomicanjem točke mjerenja dalje od stijenke kivete prema njenom središtu može se ukloniti učinak raspršenja svjetlosti na stijenkama kivete na rezultat mjerenja. Također, mjerenja nerazrijeđenih NE rezultiraju većom prosječnom veličinom kapljica zbog mogućih interakcija među kapljicama koje utječu na rezultat mjerenja (“Zetasizer Advance Series User guide,” 2022).

Za uzorke formulacija NE s kitozonom očekuje se veća prosječna veličina kapljica nego za uzorke primarnih anionskih NE zbog prisutnosti molekula kitozana na površini uljnih kapljica.

Dodatkom kitozana u vodenu fazu manje je izražen porast veličine kapljica u slučaju oligomera kitozana u usporedbi s kitozanom male molekulske mase jer je postojala razlika u molekulskoj masi između oligomera kitozana (4-6 kDa) i kitozana male molekulske mase (50-190 kDa). Ponovno su rezultati mjerenja nerazrijeđenih formulacija bili nepouzdana i nisu bili usporedivi s rezultatima prethodno provedenih istraživanja na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju. Razrjeđenjem formulacija od 50× do 500× nije zamijećena značajnija promjena prosječne veličine kapljica.

Zamijećeno je povećanje prosječne vrijednosti veličine kapljica uzoraka onih NE kojima su otopine kitozana bile dodane naknadno u vodenu fazu NE, što je bilo očekivano i u skladu s prethodnim istraživanjima (Jurišić Dukovski, 2021). Pretpostavlja se da je razlog povećanim vrijednostima uzoraka NE kojima je kitozan dodan u vodenu fazu NE u odnosu na vrijednosti uzoraka NE kojima je kitozan dodan prije pripreve grubih emulzija smještaj lanaca kitozana među molekule površinski aktivnih tvari na površini uljnih kapljica tijekom procesa mikrofluidizacije (Jurišić Dukovski, 2021).

Razrjeđenjem dolazi do značajnijeg smanjenja veličine kapljica, što također može biti posljedica različite organizacije molekula kitozana na površini uljnih kapljica.

Mjerenja veličine kapljica pri kutu od $174,7^\circ$ pokazuju značajno povećane prosječne vrijednosti nerazrijeđenih uzoraka sekundarnih kationskih NE s kitozanom u odnosu na uzorke primarne anionske NE. Primijećena je smanjena veličina kapljica razrijeđenih uzoraka NE u odnosu na nerazrijeđene, što može biti posljedica međusobnog odmicanja kapljica u razrijeđenim uzorcima NE u odnosu na gusto zbijene kapljice NE u nerazrijeđenim uzorcima, što bi moglo smanjiti zasjenjenje kapljica i mjerenje učiniti preciznijim. Također slično rezultatima dobivenima za mjerenja pri kutu detekcije od 90° , veća je prosječna veličina kapljica za formulacije NE s kitozanom male molekulske mase te dolazi do značajnijeg smanjenja prosječne veličine kapljica sve većim razrjeđivanjem uzoraka NE u koje je kitozan dodan naknadno u vodenu fazu NE. Rezultati mjerenja veličine kapljica pri kutovima detekcije od 90° i $174,7^\circ$ usporedivi su glede odnosa među uzorcima.

Indeks polidisperznosti (PDI) pri svim razrjeđenjima primarne anionske NE manji je od 0,2, što upućuje na usku raspodjelu veličina kapljica, tj. visoku homogenost te na odgovarajuću stabilnost. Vrijednosti PDI svih razrjeđenja sekundarnih kationskih NE u koje su oligomer te polimer male molekulske mase kitozana dodani prije pripreve grubih emulzija također su u blizini vrijednosti 0,2 te upućuju na stabilnost i dobru homogenost uzoraka. Rezultati mjerenja pri kutu detekcije od 90° za neka razrjeđenja NE u koju je oligomer kitozana dodan naknadno u

vanjsku fazu NE imaju vrijednosti PDI u rasponu od 0,2 do 0,3 (Tablica 3). Vrijednosti dobivene mjerenjem indeksa polidisperznosti pri kutu detekcije od $174,7^\circ$ podudarne su s vrijednostima dobivenima za mjerenja pri kutu detekcije od 90° (Tablica 4), uz opažanje kako pojedina razrjeđenja NE u koju je dodan polimer kitozana male molekulske mase postižu značajno veće vrijednosti, do 0,5 – to upućuje na znatno manju homogenost NE te potencijalne probleme vezano uz stabilnost takvih NE.

Tablica 3. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti NE razrijeđenih 50, 100 i 500 puta pročišćenom vodom, mjereni pri kutu detekcije od 90°. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	Razrjeđenje	Veličina kapljica (nm)	Indeks polidisperznosti
N	50×	180,2±2,7	0,106±0,024
	100×	181,0±3,4	0,076±0,029
	500×	182,1±3,6	0,084±0,034
NC oligo	50×	181,5±4,5	0,119±0,026
	100×	179,1±1,8	0,122±0,018
	500×	174,7±3,2	0,074±0,026
NC LMW	50×	197,0±8,4	0,150±0,024
	100×	187,3±5,2	0,139±0,017
	500×	173,1±2,5	0,100±0,015
N+C oligo	50×	227,9±4,2	0,232±0,011
	100×	202,9±8,2	0,181±0,038
	500×	183,7±1,7	0,124±0,028
N+C LMW	50×	274,7±7,6	0,306±0,034
	100×	249,7±39,8	0,257±0,031
	500×	204,5±6,4	0,176±0,027

Tablica 4. Veličina kapljica i indeks polidisperznosti nerazrijeđenih NE i NE razrijeđenima 50, 100 i 500 puta pročišćenom vodom, mjereni pri kutu detekcije od 174,7°. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	Razrjeđenje	Veličina kapljica (nm)	Indeks polidisperznosti
N	1×	180,2±4,2	0,172±0,021
	50×	154,9±3,4	0,09±0,030
	100×	154,5±3,2	0,089±0,021
	500×	154,1±3,9	0,084±0,023
NC oligo	1×	301,2±6,7	0,224±0,015
	50×	164,8±3,2	0,140±0,021
	100×	162,4±2,1	0,112±0,026
	500×	158,4±3,0	0,106±0,022
NC LMW	1×	356,4±11,9	0,266±0,017
	50×	174,7±6,1	0,169±0,018
	100×	170,1±6,1	0,142±0,029
	500×	158,6±1,5	0,093±0,017
N+C oligo	1×	332,3±3,7	0,295±0,009
	50×	191,3±3,4	0,226±0,013
	100×	173,2±7,9	0,165±0,029
	500×	159,4±1,9	0,095±0,020
N+C LMW	1×	437,2±14,8	0,506±0,033
	50×	222,8±5,1	0,284±0,010
	100×	198,3±10,8	0,241±0,032
	500×	174,1±6,1	0,162±0,031

4.2.2. Zeta-potencijal

NE su složeni sustavi i DLVO teorija nam omogućava razumijevanje interakcija među kapljicama unutarnje faze i utjecaja tih interakcija na stabilnost sustava (“Aulton’s Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines,” 2017). Naboj kapljica unutarnje faze sekundarnih kationskih NE s kitozanom posljedica je ionizacije funkcionalnih skupina na

površini kapljica. Uz pozitivno nabijenu površinu nalaze se negativno nabijeni ioni u otopini, tako da ih je uz samu površinu kapljice najviše, a zatim se, s udaljenošću od kapljice unutarnje faze, broj pozitivnih i negativnih iona izjednačava. Opisanu pojavu nazivamo dvostrukim električnim slojem. Dvostruki električni sloj sastoji se od triju dijelova. Prvi sloj čine, u ovom slučaju ionizirane skupine na površini, neposredno uz njih je drugi sloj negativnih iona, koji čine tzv. Sternov sloj čija je debljina reda veličine iona. Treći dio čini Gouy-Chapmanov sloj (difuzijski sloj dvostrukog sloja). Potencijal je najveći na površini kapljice, potom naglo opada (Sternov sloj), a zatim eksponencijalno (Gouy-Chapmanov sloj). Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema elektrodi suprotnog predznaka, a ta se pojava naziva elektroforetskom gibljivošću. Zajedno s česticama giba se Sternov sloj te dio vezanih molekula otapala. Može se zamisliti da se zajedno s česticom giba mali volumen medija odijeljen od ostalih molekula vode tzv. plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti te plohe smicanja naziva se zeta-potencijal. Zeta-potencijal važan je jer se lako može odrediti iz elektroforetske gibljivosti čestica, a o njemu i naboju na površini kapljica unutarnje faze ovisi stabilnost pripremljenih NE.

Koncentracije uzorka koje se mogu izmjeriti ovisit će o optičkim svojstvima uzorka, veličini kapljica te polidisperznosti raspodjele veličina kapljica unutarnje faze (“Zetasizer Advance Series User guide,” 2022). Optimalna koncentracija uzorka za određivanje zeta-potencijala mora se odrediti eksperimentalno mjerenjem uzorka pri različitim razrjeđenjima te promatranjem učinka razrjeđenja na vrijednost zeta potencijala. Stoga je u ovom diplomskom radu zeta-potencijal određen nerazrijeđenim NE i NE razrijeđenima 50, 100 i 500 puta u 10 mM otopini NaCl-a te u 2,5%-tnoj otopini glicerola pri mjernom kutu od $174,7^\circ$. Razrjeđivanje NE 10 mM otopinom NaCl-a provedeno je radi usporedbe s rezultatima prethodnih istraživanja (Jurišić Dukovski, 2021). 2,5%-tna otopina glicerola korištena je za razrjeđivanje NE jer otopina glicerola čini vanjsku, vodenu fazu svih pripremljenih NE.

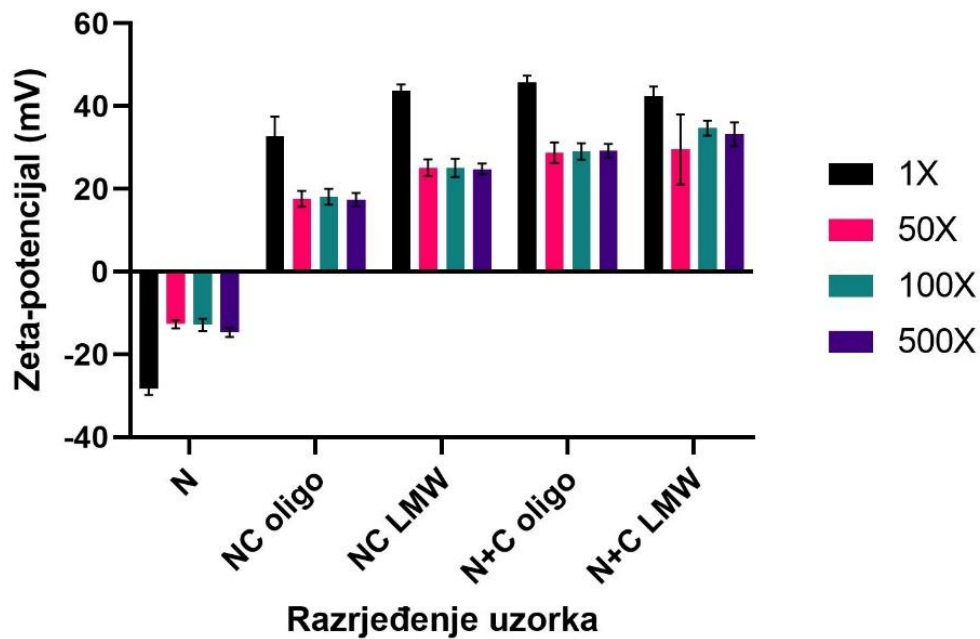
Uzorci primarne anionske NE imali su, kao što je bilo očekivano, negativan zeta-potencijal (Slika 3 i 4). Dodatkom oligomera kitozana ili kitozana male molekulske mase prije procesa mikrofluidizacije, zeta-potencijal iz negativnih vrijednosti, kao što je bilo i očekivano, prelazi u pozitivne vrijednosti. Ipak, manje su vrijednosti zeta-potencijala izmjerene nakon dodatka oligomera kitozana, što je moguće pripisati boljoj interakciji pozitivno nabijenih skupina oligomera kitozana s negativno nabijenim skupinama na površini kapljica ulja, čime se smanjuje broj slobodnih pozitivno nabijenih skupina oligomera kitozana na površini kapljica (Jurišić Dukovski, 2021).

Apsolutne vrijednosti zeta-potencijala potrebne kako bi se osigurala dovoljna elektrostatska stabilizacija nanosustava s kitozanom, koji je površinski aktivna tvar velike molekulske mase i pruža sustavu značajnu steričku stabilizaciju, mogu biti niže od 30 mV. Za razliku od toga, kako bi bila osigurana dugoročna stabilnost NE stabiliziranih dodatkom površinski aktivnih tvari male molekulske mase, koje ne osiguravaju dovoljnu steričku stabilizaciju, potrebna je apsolutna vrijednost zeta-potencijala od barem 30 mV ili veća kako bi se postigla dovoljna elektrostatska stabilizacija sustava (Jurišić Dukovski, 2021).

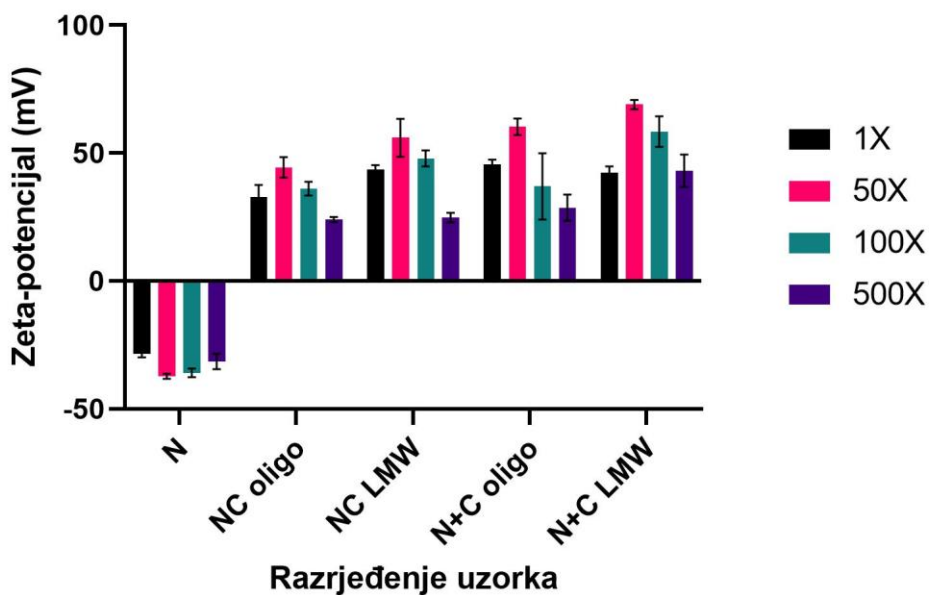
Promjena iz negativnih vrijednosti zeta-potencijala u pozitivne vidi se i na NE u koje je kitozan dodavan naknadno, po završetku procesa mikrofluidizacije. Također, vrijednosti zeta-potencijala ovih formulacija značajno su veće u odnosu na vrijednosti dobivene za NE s kitozanom dodanim prije procesa mikrofluidizacije (Slika 3 i 4), što se može protumačiti stvaranjem miješanog sloja molekula anionskih površinski aktivnih tvari i lanaca kitozana na granici faza tijekom procesa mikrofluidizacije čiji je ukupni naboj pozitivan (Jurišić Dukovski, 2021).

Apsolutne vrijednosti zeta-potencijala NE razrijeđenih 10 mM otopinom NaCl manje su u usporedbi s vrijednostima nerazrijeđenih formulacija (Slika 3). Dodatkom elektrolita ili povećanjem njegove koncentracije u vanjskoj fazi, u ovom slučaju NaCl, komprimira se dvostruki električni sloj pa se smanjuje zeta-potencijal (“Aulton’s Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines,” 2017).

Apsolutna vrijednost zeta-potencijala svih NE pri ispitivanim razrjeđenjima značajno je veća u 2,5%-tnoj (*m/m*) otopini glicerola nego u 10 mM-oj otopini NaCl-a (Slika 3 i 4). Razlog je tome primjena otopine neionizirane tvari u odnosu na elektrolitnu otopinu (10 mM otopina NaCl-a) (Pugh, 2017). U odnosu na vrijednosti zeta-potencijala nerazrijeđenih NE, vrijednosti zeta-potencijala uzoraka NE razrijeđenih 50 puta 2,5%-tnom (*m/m*) otopinom glicerola bile su značajno veće, a pri većim razrjeđenjima vrijednosti su bile manje (Slika 4).



Slika 3. Ovisnost zeta-potencijala o razrjeđenju nanoemulzija 10 mM-nom otopinom NaCl-a. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).



Slika 4. Ovisnost zeta-potencijala o razrjeđenju nanoemulzija 2,5%-tnom (m/m) otopinom glicerola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

4.3. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

Temeljem fizičko-kemijske karakterizacije NE s oligomerom kitozana te jednostavnosti pripreme, NE kojima se oligomer kitozana dodaje u vodenu fazu prije postupka mikrofluidizacije odabrane su za daljnja ispitivanja mukoadhezivnosti. Reološke se metode dugi niz godina koriste u ispitivanjima mukoadhezivnosti polimera i tekućih formulacija. Osnovna ideja je da se miješanjem otopine polimera ili formulacije s mucinom polimerni lanci i lanci mucina međusobno isprepliću, a to rezultira reološkom promjenom te je dokaz mukoadhezivnih reakcija (Jurišić Dukovski, 2021). Kitozan mukoadhezivno djeluje temeljem mehanizama elektrostatske interakcije, vodikovih veza i hidrofobnih interakcija s negativno nabijenim lancima mucina, zato se svojstva mukoadhezivnosti očekuju i za pripravljene sekundarne NE s kitozanom (Jurišić Dukovski, 2021).

4.3.1. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija reološkom metodom

Mukoadhezivna svojstva ispitana su rotacijskim testom pomoću reometra s mjernim tijelom stožac-ploča za uzorke NE razrijeđene 20 %-tnom (m/m) disperzijom mucina u omjeru 1:1 te za kontrolne uzorke pripravljene razrjeđivanjem 20%-tne (m/m) disperzije mucina pročišćenom vodom u omjeru 1:1 i razrjeđivanjem NE pročišćenom vodom u omjeru 1:1. Pretpostavlja se da je pri korištenju ove metode viskoznost smjese mucina i ispitivane NE zbroj vrijednosti viskoznosti disperzije mucina, viskoznosti NE i komponente koja proizlazi iz interakcije NE i mucina, a ona je izražena kao viskoznost uzrokovana bioadhezijom, η_b (Jurišić Dukovski, 2021). Viskoznost pojedinog uzorka izmjerena pri brzini smicanja 100 s^{-1} i temperaturi 34°C zabilježena je i korištena u izračunu vrijednosti viskoznosti uzrokovane bioadhezijom (η_b) prema izrazu navedenom u odjeljku 3.2.3.3. ovoga rada. Vrijednosti η_b prikazane su tablicom 5, a ukazuju na to da čak i NE bez kitozana posjeduje bioadhezivna svojstva, no ta su svojstva značajno bolje izražena kod sekundarnih kationskih NE s kitozanom. To je dokaz postojanja interakcije kitozana smještenog na površini uljnih kapljica i lanaca mucina. Također je vidljivo da su postignute veće vrijednosti viskoznosti uzrokovane bioadhezijom za uzorak s oligomerom

kitozana u odnosu na uzorak s polimerom kitozana, iako je standardna devijacija zamjetno veća u odnosu na standardne devijacije ostalih dvaju uzoraka pa je vrijednost i manje pouzdana. Potrebno je napraviti dodatna ispitivanja kako bi se sa sigurnošću moglo zaključiti o boljem svojstvu viskoznosti uzrokovane bioadhezijom koje pruža sekundarna kationska NE pripravljena s oligomerom kitozana u odnosu na NE pripravljenu s polimerom kitozana.

Tablica 5. Viskoznost uzrokovana bioadhezijom primarne anionske NE te sekundarnih kationskih NE s kitozonom nakon miješanja formulacija s 20%-tnom (*m/m*) disperzijom mucina. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	η_b (mPas)
N	6,74 \pm 4,21
NC oligo	30,44 \pm 12,60
NC LMW	26,43 \pm 6,24

4.3.2. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom određivanjem veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Interakcijom mucina i kitozana na površini kapljica uljne faze pretpostavlja se da dolazi od promjene veličine i raspodjele veličina čestica. Iz tog razloga, određena je veličina čestica i indeks polidisperznosti u uzorcima u kojima su NE pomiješane s disperzijom mucina u STF. Uzorci za mjerenje dobiveni su na način da je u NE dodana 1%-tna (*m/m*) disperzija mucina u STF u omjeru 40:7 (*V/V*) kako bi metoda bila prikladna za ispitivanje mukoadhezivnosti NE za oftalmičku primjenu (Jurišić Dukovski, 2021). Omjer 40:7 (*V/V*) odabran je za miješanje NE s disperzijom mucina zbog toga što prosječni volumen jedne kapi za oko iznosi 40 μL , a prosječni volumen suznog filma iznosi 7 μL (Jurišić Dukovski, 2021). Uzorci su bili mjereni odmah nakon dodatka disperzije mucina (u nultoj minuti), nakon 5 minuta miješanja te nakon 20 minuta miješanja pri brzini od 300 okr/min i sobnoj temperaturi. Prije svakog mjerenja, izuzeti uzorak bio je razrijeđen 100 puta pročišćenom vodom. Određivanje veličine kapljica NE i indeksa polidisperznosti provedeno je uređajem Zetasizer Ultra pri mjernom kutu od 174,7°.

Veličina čestica primarne anionske NE nije se značajno promijenila tijekom 20 minuta miješanja, no veličine čestica sekundarnih kationskih NE značajnije su se promijenile, a veća je promjena zamijećena pri uzorku NE s polimerom kitozana male molekulske mase. Tako je

veličina kapljica NE s oligomerom kitozana pri razrjeđenju 100× pročišćenom vodom bila 162,4 nm, a u nultoj minuti nakon dodavanja disperzije mucina veličina čestica bila je 301,2 nm; veličina kapljica NE s polimerom kitozana male molekulske mase pri razrjeđenju 100× pročišćenom vodom bila je 170,1 nm, a u nultoj minuti nakon dodatka disperzije mucina bila je 356,4 nm. To znači da je postignuto vezanje lanaca kitozana s površine uljnih kapljica s lancima mucina iz disperzije i zato su čestice aglomerata veće nego kapljice NE. Također se zamjećuje kod NE s oligo-kitozanom kako je nakon 5 minuta miješanja postignuta mnogo veća veličina čestica, a nakon 20 minuta veličina čestica se smanjila (Tablica 6). Moguće objašnjenje ove razlike u veličini čestica nakon dodatnih 15 minuta miješanja jest postizanje kompaktnijeg pakiranja lanaca kitozana i mucina međusobno. Kod NE s kitozanom male molekulske mase nakon 5 minuta miješanja veličina čestica porasla je do gotovo 2 μm te se nije značajnije promijenila nakon ukupno 20 minuta miješanja (Tablica 6). Standardna devijacija za gotovo sve uzorke sekundarnih kationskih NE u interakciji s mucinima bila je prilično velika jer je riječ o heterogenim uzorcima.

Tablica 6. Veličina čestica i indeks polidisperznosti NE kojima je dodana disperzija 1% (*m/m*) mucina u STF-u u omjeru 40:7 neposredno nakon dodavanja disperzije te nakon 5 i 20 minuta miješanja. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (*n*=3).

Uzorak	Vrijeme miješanja (min)	Veličina čestica (nm)	Indeks polidisperznosti
N	0	180,2±4,2	0,175±0,021
	5	161,4±7,9	0,142±0,037
	20	153,5±1,2	0,098±0,018
NC oligo	0	301,2±6,7	0,244±0,015
	5	507,6±370,2	0,331±0,062
	20	215,5±6,4	0,321±0,031
NC LMW	0	356,4±11,9	0,266±0,017
	5	1862,3±228,4	0,221±0,105
	20	1780,9±494,2	0,155±0,025

4.3.3. Ispitivanje mukoadezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija mjerenjem zeta-potencijala

Promjena zeta-potencijala kapljica unutarnje faze pokazatelj je interakcije mucina s kitozonom na površini kapljica. Iz tog razloga, određen je zeta-potencijal uzorcima u kojima su NE pomiješane s disperzijom mucina u STF. Mjerenje zeta-potencijala NE provođeno je uređajem Zetasizer Ultra pri mjernom kutu od $174,7^\circ$. Uzorci za mjerenje dobiveni su na način da je u NE dodana 1%-tna (*m/m*) disperzija mucina u STF u omjeru 40:7 te su uzorci bili mjereni odmah nakon dodatka disperzije (u nultoj minuti), nakon 5 minuta miješanja te nakon 20 minuta miješanja. Prije svakog mjerenja, izuzeti uzorak bio je razrijeđen 100 puta pročišćenom vodom. Rezultati za sve uzorke ukazuju na pad zeta-potencijala prema sve nižim vrijednostima što dulje traje miješanje zbog elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih krajeva lanaca kitozana s lancima mucina, čiji su krajevi negativno nabijeni. Može se primijetiti kako su vrijednosti zeta-potencijala tijekom miješanja za NE s oligomerom kitozana mnogo niže nego za NE s kitozonom male molekulske mase, iako je kod NE s kitozonom male molekulske mase izmjerena veća početna vrijednost zeta-potencijala (Tablica 7). Prisutnost kitozana manje molekulske mase (oligomer kitozana od 4 do 6 kDa vs polimer kitozana male molekulske mase od 50 do 190 kDa) osigurava bolju interakciju s mucinom te veće smanjenje zeta-potencijala.

Tablica 7. Zeta-potencijal NE kojima je dodana disperzija 1% (*m/m*) mucina u STF-u u omjeru 40:7 neposredno nakon dodavanja disperzije te nakon 5 i 20 minuta miješanja. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Uzorak	Vrijeme mjerenja (min)	Zeta-potencijal (mV)
N	0	-28,4 \pm 1,4
	5	-40,6 \pm 3,4
	20	-41,3 \pm 2,5
NC oligo	0	32,8 \pm 4,7
	5	-15,3 \pm 5,8
	20	-22,0 \pm 3,4
NC LMW	0	43,7 \pm 1,6
	5	1,3 \pm 3,6
	20	-1,3 \pm 3,5

5. ZAKLJUČCI

- Sekundarne kationske NE s oligomerom kitozana uspješno su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije.
- Optimalna metoda pripreve uključuje dodatak oligomera kitozana u vodenu fazu prije postupka homogenizacije.
- Sekundarne kationske NE s oligomerom kitozana karakterizira manja prosječna veličina kapljica i manji indeks polidisperznosti u odnosu na sekundarne kationske NE s polimerom kitozana male molekulske mase.
- Sekundarne kationske NE s oligomerom kitozana karakterizira niža vrijednost zeta-potencijala u odnosu na sekundarne kationske NE s polimerom kitozana male molekulske mase.
- Ispitivanje mukoadhezivnosti reološkom metodom potvrdilo je očekivanu bioadhezivnost NE s oligomerom kitozana, koja nije značajno različita od bioadhezivnosti NE s polimerom kitozana male molekulske mase. Zbog velike standardne devijacije rezultata viskoznosti uzrokovane bioadhezijom nakon interakcije kapljica unutarnje faze s mucinom potrebno je provesti dodatna ispitivanja.
- Ispitivanje mukoadhezivnosti NE mjerenjem veličine čestica i indeksa polidisperznosti nakon miješanja NE s disperzijom mucina potvrđuje interakciju lanaca kitozana na površini uljnih kapljica i lanaca mucina, pri čemu je veličina aglomerata uljnih kapljica s oligomerom kitozana manja u odnosu na veličinu aglomerata uljnih kapljica s kitozanom male molekulske mase. Također, zabilježene su velike standardne devijacije rezultata prosječne veličine čestica nakon interakcije kapljica unutarnje faze s mucinom.
- Ispitivanje mukoadhezivnosti NE mjerenjem zeta-potencijala pokazalo je promjenu vrijednosti zeta-potencijala iz pozitivnih u negativne nakon miješanja NE s disperzijom mucina, a ta je promjena bila izraženija za NE s oligomerom kitozana u odnosu na NE s polimerom kitozana male molekulske mase, što ukazuje na bolja mukoadhezivna svojstva formulacije s oligomerom kitozana.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

BAK – benzalkonijev klorid; kvaterna amonijeva sol, primarno se koristi kao konzervans i antimikrobna tvar, a može se koristiti i kao površinski aktivna tvar (b4brands.com).

CKC – cetalkonijev klorid; pozitivno nabijeni C16 alkilni derivat benzalkonijevog klorida s amfipatskim svojstvom koje mu omogućuje korištenje u različitim formulacijama; Američka Agencija za hranu i lijekove odobrila je njegovu upotrebu u bezreceptnim lijekovima kao sredstvo za zaštitu kože (go.drugbank.com).

DEWS – engl. Dry Eye WorkShop, Međunarodna radna skupina za bolest suhog oka.

DLS metoda– engl. *dynamic light scattering*, metoda dinamičkog raspršenja svjetla.

EEA – engl. *European Economy Area*, Europski gospodarski prostor.

EMA – engl. *European Medicines Agency*, Europska agencija za lijekove.

FDA – engl. *Food and Drug Administration*, Američka agencija za hranu i lijekove.

HA – engl. *Hyaluronic acid*, hijaluronska kiselina.

HCE-2 – engl. *human corneal epithelial cells*, epitelne stanice rožnice.

IL-6 – interleukin 6.

IL-8 – interleukin 8.

LPS – lipopolisaharid.

Mjerno tijelo CP – engl. *cone-plate*, mjerno tijelo stožac-ploča.

n – broj mjerenja

N – primarna anionska nanoemulzija

N+C LMW – sekundarna kationska nanoemulzija s polimerom kitozana u koju je polimer dodan nakon procesa mikrofluidizacije

N+C oligo – sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana u koju je oligomer dodan nakon procesa mikrofluidizacije

NC LMW – sekundarna kationska nanoemulzija s polimerom kitozana male molekulske mase u koju je polimer dodan prije procesa mikrofluidizacije

NC oligo – sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana u koju je oligomer dodan prije procesa mikrofluidizacije

NE – nanoemulzija.

NF- κ B - nuklearni faktor- κ B.

NP – nije primjenjivo.

OAHFA – engl. (*O-acyl*)- ω hydroxy fatty acid, (O-acil)- ω -hidroksimasna kiselina.

PAA – engl. *polyacrylic acid*, poliakrilna kiselina.

PDI – indeks polidisperznosti.

pH – kratica od lat. *potentia hydrogenii*, snaga vodika; broj koji služi kao mjera kiselosti, odnosno lužnatosti vodenih otopina, negativni dekadski logaritam množinske koncentracije (točnije aktiviteta) vodikovih iona u otopini (www.enciklopedija.hr).

PKC α – protein kinaza C alfa.

SA – engl. *syalic acid*, sijalinska kiselina.

STF – engl. *Simulated Tear Fluid*, simulirana suzna tekućina.

TPP – natrijev tripolifosfat.

U/V NE – nanoemulzija tipa ulje u vodi, gdje je ulje unutarnja faza, a vanjska je faza voda.

V/U NE – nanoemulzija tipa voda u ulju, gdje je voda unutarnja faza, a vanjska je faza ulje.

WHO – engl. *World Health Organisation*, Svjetska zdravstvena organizacija.

η_b - viskoznost uzrokovana bioadhezijom.

η_m – viskoznost disperzije mucina (10 %, *m/m*).

η_n – viskoznost nanoemulzije pomiješane sa STF-om.

η_{n+m} – viskoznost nanoemulzije pomiješane s disperzijom mucina.

7. LITERATURA

Alonso, M.J., Sánchez, A., The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2010, 55, 1451–1463.

Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, n.d. 933.

Awwad, S., Mohamed Ahmed, A.H.A., Sharma, G., Heng, J.S., Khaw, P.T., Brocchini, S., Lockwood, A., Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol*, 2017, 174, 4205–4223.

Benzalkonium Chloride - Uses, Side Effects, Information, 2017,

<https://b4brands.com/resources/ingredient-directory/benzalkonium-chloride/>, pristupljeno 16.6.2022.

Blink. Merriam-Webster.com Dictionary, Merriam-Webster, <https://www.merriam-webster.com/dictionary/blink.>, pristupljeno 10.6.2022.

Cetalkonium, ažurirano 21.3.2021, <https://go.drugbank.com/drugs/DB11583>, pristupljeno 16.6.2022.

Chen, H., Jin, Y., Sun, L., Li, X., Nan, K., Liu, H., Zheng, Q., Wang, B., Recent Developments in Ophthalmic Drug Delivery Systems for Therapy of Both Anterior and Posterior Segment Diseases. *Colloid Interface Sci. Commun.*, 2018, 24, 54–61.

Choi, S.H., Lionberger, R.A., Clinical, Pharmacokinetic, and In Vitro Studies to Support Bioequivalence of Ophthalmic Drug Products. *AAPS J*, 2016, 18, 1032–1038.

Christie, W., Phosphatidylethanolamine and Related Lipids (N-acylphosphatidylethanolamine, N-monomethylphosphatidylethanolamine, N,N-dimethylphosphatidylethanolamine, phosphatidylethanol, lysophosphatidylethanolamine - structure, occurrence, biochemistry), *Lipidmaps.org.*, 2022,

https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/complex/pe/index.htm, pristupljeno 16.6.2022.

da Silva, S.B., Ferreira, D., Pintado, M., Sarmiento, B., Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery—In vitro tests. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 84, 112–120.

Dauil, P., Amrane, M., Garrigue, J.-S., Novasorb® Cationic Nanoemulsion and Latanoprost: The Ideal Combination for Glaucoma Management? *J Eye Dis Disord*, 2017, 02.

Dauil, P., Amrane, M., Ismail, D., Georgiev, G., Cwiklik, L., Baudouin, C., Leonardi, A., Garhofer, G., Garrigue, J.-S., Cationic Emulsion-Based Artificial Tears as a Mimic of Functional Healthy Tear Film for Restoration of Ocular Surface Homeostasis in Dry Eye Disease. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2020, 36, 355–365.

Dauil, P., Feraille, L., Elena, P.-P., Garrigue, J.-S., Comparison of the Anti-Inflammatory Effects of Artificial Tears in a Rat Model of Corneal Scraping. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2016, 32, 109–118.

Dauil, P., Guenin, S., Hamon de Almeida, V., Garrigue, J.-S., Anti-inflammatory activity of CKC-containing cationic emulsion eye drop vehicles. *Mol Vis*, 2018, 24, 459–470.

Dave, R.S., Goostrey, T.C., Ziolkowska, M., Czerny-Holownia, S., Hoare, T., Sheardown, H., Ocular drug delivery to the anterior segment using nanocarriers: A mucoadhesive/mucopenetrative perspective. *J. Controlled Release*, 2021, 336, 71–88.

de la Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., Alonso, M.J., Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2010, 62, 100–117.

Eftimov, P., Olżyńska, A., Melcrová, A., Georgiev, G.As., Daull, P., Garrigue, J.-S., Cwiklik, L., Improving Stability of Tear Film Lipid Layer via Concerted Action of Two Drug Molecules: A Biophysical View. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 9490.

Fang, I.-M., Yang, C.-H., Yang, C.-M., Chitosan Oligosaccharides Attenuate Ocular Inflammation in Rats with Experimental Autoimmune Anterior Uveitis. *Mediators Inflamm*, 2014, 827847.

FDA Approves First Generic of Restasis, 2022, <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-generic-restasis>, pristupljeno 15.4.2022.

Garrigue, J.-S., Amrane, M., Faure, M.-O., Holopainen, J.M., Tong, L., Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2017, 33, 647–661.

Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 69, 1–9.

Hauswirth, S., Dry eye disease onset at a younger age, *Optom. Times*, 2022, 14 (2), p., <https://www.optometrytimes.com/view/dry-eye-disease-onset-at-a-younger-age>, pristupljeno 27.5.2022.

Ikervis - European Medicines Agency, 2018.

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ikervis>, pristupljeno 20.4.2022.

Janagam, D.R., Wu, L., Lowe, T.L., Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 122, 31–64.

Jurišić Dukovski, B., Juretić, M., Bračko, D., Randjelović, D., Savić, S., Crespo Moral, M., Diebold, Y., Filipović-Grčić, J., Pepić, I., Lovrić, J., Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *Int J Pharm*, 2020, 576, 118979.

Jurišić Dukovski, B. Razvoj funkcionalnih kationskih nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2021.

Küllenberg, D., Taylor, L.A., Schneider, M. et al., Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis*, 2012, 11, 3.

Lallemant, F., Daull, P., Benita, S., Buggage, R., Garrigue, J.-S., Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv*, 2012, 604204.

Lysolecithins, FRAmelco 2022. <https://framelco.com/products/lysolecithins/>, pristupljeno 15.6.2022.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 71388, Tyloxapol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyloxapol>., pristupljeno 14.6.2022.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 753, Glycerol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycerol>., pristupljeno 30.5.2022.

Parwar, B., Tong, J. and Perry, J., 2013. *Nasolacrimal System Anatomy: Embryology, Puncta, Canaliculi*. Emedicine.medscape.com. <https://emedicine.medscape.com/article/835092-overview>, pristupljeno 10.6.2022.

pH. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021.
<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=48063>, pristupljeno 14.6.2022.

PHOSPHATIDYLCHOLINE: Overview, Uses, Side Effects, Precautions, Interactions, Dosing and Reviews 2022. <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-501/phosphatidylcholine>, pristupljeno 16.6.2022.

Pisella, P.-J., Labetoulle, M., Doan, S., Cochener-Lamard, B., Amrane, M., Ismail, D., Creuzot-Garcher, C., Baudouin, C., Topical ocular 0.1% cyclosporine A cationic emulsion in dry eye disease patients with severe keratitis: experience through the French early-access program. *Clin Ophthalmol*, 2018, 12, 289–299.

Poloxamer 188: Uses, Interactions, Mechanism of Action, *DrugBank Online* 2022.
<https://go.drugbank.com/drugs/DB11333>, pristupljeno 14.6.2022.

Pugh, D., The Dangers of Dilution When Measuring Water Based Pharmaceutical Suspensions and How Nanoflex Overcomes these Obstacles., n.d., *Am. J. Adv. Drug Delivery*, 5, 0–0.

Qu, H., Wang, J., Wu, Y., Zheng, J., Krishnaiah, Y.S.R., Absar, M., Choi, S., Ashraf, M., Cruz, C.N., Xu, X., 2018. Asymmetric flow field flow fractionation for the characterization of globule size distribution in complex formulations: A cyclosporine ophthalmic emulsion case. *Int J Pharm*, 2018, 538, 215–222.

Ræder, S., Klyve, P., Utheim, T.P., Tørre øyne – diagnostikk og behandling. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.*, 2019.

Rahman, Z., Xu, X., Katragadda, U., Krishnaiah, Y.S.R., Yu, L., Khan, M.A., Quality by Design Approach for Understanding the Critical Quality Attributes of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion. *Mol. Pharmaceutics*, 2014, 11, 787–799.

Rawal, S.U., Patel, M.M., Lipid nanoparticulate systems, U: Lipid Nanocarriers for Drug Targeting. *Elsevier sci.*, 2018, pp. 49–138.

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. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 156, 232–238.

Rouen, P.A., White, M.L., Dry Eye Disease: Prevalence, Assessment, and Management. *Home Healthc. Now*, 2018, 36, 74–83.

Sheskey, P.J., Cook, W.G., Cable, C.G., Handbook of pharmaceutical excipients, 8th ed. Pharmaceutical press American pharmacists association, London Washington (D.C.), 2017, str. 590-593; 728-735.

Singh, M., Bharadwaj, S., Lee, K.E., Kang, S.G., Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J. Controlled Release*, 2020, 328, 895–916.

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Controlled Release*, 2017, 252, 28–49.

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.

Weisenberger, K., Fogt, N., Swingle Fogt, J., Comparison of nanoemulsion and non-emollient artificial tears on tear lipid layer thickness and symptoms. *J. Optom.*, 2021, 14, 20–27.

What Is Sphingomyelin? – *Creative Proteomics Blog*, *Creative-proteomics.com.*, 2021.
<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/what-is-sphingomyelin/>, pristupljeno
16.6.2022.

Xu, X., Sun, L., Zhou, L., Cheng, Y., Cao, F., Functional chitosan oligosaccharide nanomicelles for topical ocular drug delivery of dexamethasone. *Carbohydr. Polym.*, 2020, 227, 115356.

Zemanová, M., DRY EYE DISEASE. A REVIEW. *Cesk Slov Oftalmol*, 2021, 77, 107–119.

Zetasizer Advance Series User guide, 2022, 256.

Zignani, M., Tabatabay, C., Gurny, R., Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *Drug Deliv.*, 1995, 16, 51–60.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Bolest suhog oka bolest je površine oka koja je u današnje vrijeme česta pojava. Češće se javlja kod starijih osoba, žena, osoba koje su izložene niskoj vlažnosti zraka, osoba s autoimunim poremećajima, ali i kod mlađih osoba zbog svakodnevne dugotrajne uporabe digitalnih uređaja. Kationske nanoemulzije sa svojstvom mukoadhezivnosti stupaju u kontakt s mucinima na površini oka i namijenjene su liječenju bolesti površine oka zbog duljeg zadržavanja lijeka i veće biorasploživosti. U liječenju simptoma blagog oblika bolesti suhog oka dobre rezultate pokazuju kationske nanoemulzije pripravljene od sastavnica sličnih onima koje su fiziološki prisutne na površini oka.

U sklopu ovog diplomskog rada uspješno su pripravljene formulacije koje sadrže 2,5% (*m/m*) polusintetske smjese srednjelančanih triglicerida, 0,05% (*m/m*) lecitina, 0,25% (*m/m*) makroglicerol ricinoleata 35, 0,05% (*m/m*) kitozana – polusintetskog kationskog polimera sa svojstvom mukoadhezivnosti, 2,5% (*m/m*) glicerola – alkohola neutralnog naboja prikladnog za izotonizaciju nanoemulzija i pročišćenu vodu do 100% (*m/m*). Pripravljenim formulacijama ispitana su fizičko-kemijska svojstva: prosječna veličina, raspodjela veličina te zeta-potencijal kapljica unutarnje faze. Također, ispitano je svojstvo mukoadhezivnosti reološkom metodom te određivanjem veličine kapljica. raspodjele veličina kapljica i zeta-potencijala nanoemulzija nakon miješanja s mucinom.

Na temelju provedenih ispitivanja kao formulacija s potencijalom za daljnji razvoj ističe se sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana pripravljena dodavanjem otopine oligomera kitozana u smjesu prije priprave nanoemulzije procesom mikrofluidizacije.

Dry eye disease is an ocular surface disease common in present times, more expressed in certain populations, such as senior citizens, women, people exposed to low humidity, patients with autoimmune diseases as well as younger people due to excessive everyday use of digital devices. Cationic nanoemulsions of mucoadhesive properties interact with mucins on the ocular surface and are intended for treatment of ocular surface diseases due to longer retention time of the drug and consequently its greater bioavailability. In treating symptoms of mild form of dry eye disease, cationic nanoemulsions composed of components similar to those found as constituents of the ocular surface show good results.

Formulations prepared for purposes of this diploma thesis are composed of 2.5% (w/w) semisynthetic mixture of middle chain fatty acids, 0.05% (w/w) lecithin, 0.25% (w/w) macroglycerol ricinoleate 35, 0.05% (w/w) chitosan – semisynthetic cationic polymer with mucoadhesive properties, 2.5% (w/w) glycerol – neutrally charged alcohol suitable for nanoemulsion isotonicity and purified water to 100% (w/w). Formulations were tested for their physicochemical properties: average size, size distribution as well as zeta-potential of droplets of inner phase of nanoemulsions. In addition, mucoadhesive properties were also tested using rheological method and by measuring droplet size, size distribution and zeta-potential of nanoemulsions after the addition of mucin.

Based on all conducted tests, formulation showing the potential for further development is secondary cationic nanoemulsion with chitosan oligosaccharide formed by adding a solution of chitosan oligosaccharide to the mixture before the process of microfluidisation.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmaceutsku tehnologiju
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Razvoj oftalmičkih sekundarnih kationskih nanoemulzija s oligomerom kitozana

Matej Jaušić

SAŽETAK

Bolest suhog oka bolest je površine oka koja je u današnje vrijeme česta pojava. Češće se javlja kod starijih osoba, žena, osoba koje su izložene niskoj vlažnosti zraka, osoba s autoimunim poremećajima, ali i kod mladih osoba zbog svakodnevne dugotrajne uporabe digitalnih uređaja. Kationske nanoemulzije sa svojstvom mukoadhezivnosti stupaju u kontakt s mucinima na površini oka i namijenjene su liječenju bolesti površine oka zbog duljeg zadržavanja lijeka i veće biorasploživosti. U liječenju simptoma blagog oblika bolesti suhog oka dobre rezultate pokazuju kationske nanoemulzije pripravljene od sastavnica sličnih onima koje su fiziološki prisutne na površini oka. U sklopu ovog diplomskog rada uspješno su pripravljene formulacije koje sadrže 2,5% (*m/m*) polusintetske smjese srednjelančanih triglicerida, 0,05% (*m/m*) lecitina, 0,25% (*m/m*) makrogolglicerol ricinoleata 35, 0,05% (*m/m*) kitozana – polusintetskog kationskog polimera sa svojstvom mukoadhezivnosti, 2,5% (*m/m*) glicerola – alkohola neutralnog naboja prikladnog za izotonizaciju nanoemulzija i pročišćenu vodu do 100% (*m/m*). Pripremljenim formulacijama ispitana su fizičko-kemijska svojstva: prosječna veličina, raspodjela veličina te zeta-potencijal kapljica unutarnje faze. Također, ispitano je svojstvo mukoadhezivnosti reološkom metodom te određivanjem veličine kapljica, raspodjele veličina kapljica i zeta-potencijala nanoemulzija nakon miješanja s mucinom. Na temelju provedenih ispitivanja kao formulacija s potencijalom za daljnji razvoj ističe se sekundarna kationska nanoemulzija s oligomerom kitozana pripravljena dodavanjem otopine oligomera kitozana u smjesu prije pripreme nanoemulzije procesom mikrofluidizacije.

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

Rad sadrži: 50 stranica, 4 grafička prikaza, 7 tablica i 53 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bolest suhog oka, kationska nanoemulzija, kitozan, lecitin, makrogolglicerol ricinoleat 35, mikrofluidizacija

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

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

Dr. sc. Bisera Jurišić Dukovski, asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Kristina Radić, asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutics
Ul. kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of ophthalmic secondary cationic nanoemulsions with chitosan oligosaccharide

Matej Jaušić

SUMMARY

Dry eye disease is an ocular surface disease common in present times, more expressed in certain populations, such as senior citizens, women, people exposed to low humidity, patients with autoimmune diseases as well as younger people due to excessive everyday use of digital devices. Cationic nanoemulsions of mucoadhesive properties interact with mucins on the ocular surface and are intended for treatment of ocular surface diseases due to longer retention time of the drug and consequently its greater bioavailability. In treating symptoms of mild form of dry eye disease, cationic nanoemulsions composed of components similar to those found as constituents of the ocular surface show good results. Formulations prepared for purposes of this diploma thesis are composed of 2.5% (w/w) semisynthetic mixture of middle chain fatty acids, 0.05% (w/w) lecithin, 0.25% (w/w) macrogolglycerol ricinoleate 35, 0.05% (w/w) chitosan – semisynthetic cationic polymer with mucoadhesive properties, 2.5% (w/w) glycerol – neutrally charged alcohol suitable for nanoemulsion isotonicity and purified water to 100% (w/w). Formulations were tested for their physicochemical properties: average size, size distribution as well as zeta-potential of droplets of inner phase of nanoemulsions. In addition, mucoadhesive properties were also tested using rheological method and by measuring droplet size, size distribution and zeta-potential of nanoemulsions after the addition of mucin. Based on all conducted tests, formulation showing the potential for further development is secondary cationic nanoemulsion with chitosan oligosaccharide formed by adding a solution of chitosan oligosaccharide to the mixture before the process of microfluidisation.

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

Thesis includes: 50 pages, 4 figures, 7 tables and 53 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Dry eye disease, cationic nanoemulsion, chitosan, lecithin, macrogolglycerol ricinoleate 35, microfluidisation

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

Reviewers: **Jasmina Lovrić, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D., *Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Radić, Ph.D., *Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.