

Razvoj funkcionalnih kationskih nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka

Jurišić Dukovski, Bisera

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:163:048726>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Bisera Jurišić Dukovski

**RAZVOJ FUNKCIONALNIH KATIONSkih
NANOEMULZIJA ZA LIJEČENJE
BOLESTI SUHOG OKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Bisera Jurišić Dukovski

**RAZVOJ FUNKCIONALNIH KATIONSkih
NANOEMULZIJA ZA LIJEČENJE
BOLESTI SUHOG OKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Jasmina Lovrić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Bisera Jurišić Dukovski

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL CATIONIC NANOEMULSIONS FOR TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Prof. Jasmina Lovrić, Ph.D.

Zagreb, 2021

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasmine Lovrić. Dio eksperimenata proveden je u PLIVI Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj. Doktorsko istraživanje provedeno je u sklopu projekata: „Razvoj *in vitro/ex vivo* modela za ispitivanje permeabilnosti novih topičkih oftalmičkih lijekova“ iz programa „Partnerstvo u istraživanjima“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, „Modeliranje procesa farmaceutskog sušenja raspršivanjem emulzija u laboratorijskom i pilotnom mjerilu“ financiranog od strane industrijskog partnera PLIVA Hrvatska d.o.o. te „Nanoemulzije unaprijeđene biofarmaceutske vrijednosti za liječenje bolesti suhoga oka“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALE / ACKNOWLEDGEMENTS

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na svom prenesenom znanju i vještinama te stručnom vodstvu tijekom izrade ovog doktorskog rada. Zahvalna sam joj na svim savjetima i pomoći te razumijevanju, strpljenju i podršci.

Veliko hvala prof. dr. sc. Jeleni Filipović-Grčić na suradnji i podršci. Hvala svim djelatnicima Zavoda za Farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na prijateljskoj i ugodnoj radnoj atmosferi, pruženim savjetima i podršci. Dodatno hvala mojim cimericama iz ureda bez kojih bi ovaj period u mom životu zasigurno bio puno teži i, naravno, manje zabavan.

Veliko hvala dr. sc. Marini Juretić na prenesenom znanju o radu sa staničnim kulturama, na pomoći oko UPLC analize te na brojnim stručnim i prijateljskim savjetima.

Hvala nasl. izv. prof. dr. sc. Biserki Cetini Čižmek i Danki Bračko, mag. pharm. na izvrsnoj suradnji u okviru projekata s industrijskim partnerom PLIVA Hrvatska.

Veliko hvala farmaceutskim tehničarima Željku Vincelju i Suzani-Gabrijeli Pranjić na svojoj pomoći oko rada na mikrofluidizatoru i ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala prof. dr. sc. Snežani Savić, dr. sc. Danijeli Randjelović i Ines Nikolić, mag. farm. na pomoći oko AFM analize nanoemulzija.

Hvala Mariju Crespu Moralu, MSc. na prenesenom znanju o ex vivo modelu cijeljenja rane rožnice svinje.

Od srca sam zahvalna svojim roditeljima i sestri što su uvijek bili tu uz mene, pružajući mi ljubav i potporu.

Veliko hvala mom suprugu Aleksandru na beskrajnoj ljubavi, strpljenju i podršci. Hvala mu na društvu koje mi je pravio dok sam vikende provodila na Zavodu, na pomoći oko obrade slika i nezaboravnim izletima u PIK Vrbovec. Zahvalna sam mu što je uvijek vjerovao u mene. Bez njega to ne bi bilo to.

Za kraj, hvala mojoj Fioni, najdivnijem biću na ovome svijetu, što postoji.

SAŽETAK

Bolest suhog oka je multifaktorijalna bolest koju karakterizira nestabilnost i hiperosmolarnost suznog filma te upala površine oka. Kationske nanoemulzije tipa ulje u vodi (U/V) predstavljaju napredak u liječenju bolesti suhog oka služeći kao tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari, omogućujući pritom njihovo produljeno zadržavanje na površini oka te istodobnu nadoknadu i stabilizaciju narušenog suznog filma. Cilj ovog doktorskog rada je razvoj funkcionalne kationske nanoemulzije za liječenje bolesti suhog oka. U tu su svrhu pripravljena dva tipa nanoemulzija korištenjem mikrofluidizatora: primarne kationske nanoemulzije sa stearylaminom i sekundarne kationske nanoemulzije s kitozonom. Primarne kationske nanoemulzije s rastućim udjelima stearylamina male su veličine kapljica (< 100 nm), primjerene disperznosti ($PDI \leq 0,25$), pozitivnog zeta-potencijala (3,1-25,5 mV), prikladne pH vrijednosti, male viskoznosti i površinske napetosti $31,3-35$ mN m⁻¹. Pripravljene nanoemulzije stabilne su tijekom petomjesečne pohrane. Nakon miješanja s disperzijom mucina zapažene su promjene u veličini kapljica i zeta-potencijalu koje ukazuju na interakciju s mucinom. Takve promjene nisu bile izraženije s povećanjem udjela stearylamina na više od 0,05 % (*m/m*). Vijabilnost 3D HCE-T modela iznosila je najmanje 90 % nakon izlaganja pripremljenim formulacijama. Sekundarne kationske nanoemulzije pripravljene s manjim (NC1: 0,05 %, *m/m*) i većim (NC2: 0,3 %, *m/m*) udjelom kitozana veličine su kapljica približno 180 nm, veće homogenosti ($PDI < 0,2$) i pozitivnog zeta-potencijala (18,7 i 30 mV). Iako je formulacija NC1 pokazala bolju stabilnost, ibuprofen je uspješno uklopljen u obje formulacije (INC1 i INC2). Fizičko-kemijska svojstva (pH, viskoznost, osmolarnost i površinska napetost) pripremljenih formulacija unutar su raspona prikladnog za primjenu na oko. Formulacija INC1 stabilnija je od formulacije INC2 nakon jednomjesečne pohrane. Bakteriološka filtracija prikladna je metoda sterilizacije pripremljenih formulacija. Oslobođanje ibuprofena iz pripremljenih formulacija značajno je brže nego iz uljne otopine i suspenzije ibuprofena. Reološka karakterizacija formulacija pomiješanih s disperzijom mucina pokazala je njihov mukoadhezivni karakter koji, ipak, nije izraženiji kod formulacije INC2 s većim udjelom kitozana. Ispitivanja na 3D HCE-T modelu i *ex vivo* modelu rožnice svinje pokazala su izuzetnu biokompatibilnost INC1 formulacije. Uzimajući u obzir sve rezultate, nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina i INC1 formulacija ističu se kao vodeće formulacije s velikim potencijalom za liječenje bolesti suhog oka.

Ključne riječi: kationska nanoemulzija, bolest suhog oka, stearylamin, kitozan, lecitin, ibuprofen, 3D HCE-T model, rožnica svinje

SUMMARY

Introduction: Dry eye disease (DED) is a multifactorial disease of the ocular surface affecting a growing number of people worldwide. There are two main types of DED, namely aqueous deficient and evaporative. Both types are characterized by increased tear film osmolarity and consequent inflammation of the ocular surface, which causes apoptosis of epithelial and mucin secreting goblet cells. This promotes tear film instability, which further emphasizes hyperosmolarity and leads to self-perpetuating vicious circle of DED. Mild types of DED can be effectively treated with over-the-counter (OTC) products, often termed “artificial tears”. However, more severe DED types may require additional treatment options. So far, there is only a limited number of drugs approved for treatment of DED, such as the immunomodulator cyclosporine A, the integrin antagonist lifitegrast and the mucin and/or aqueous secretagogues diquafosol and rebamipide. Topically applied cyclosporine A is the most frequently used drug in the treatment of DED. However, its onset of action is postponed and it has to be administered for an extended period. Topical glucocorticoid pre-treatment can be used as an approach to provide faster symptom relief and improvement in ocular signs. Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) could be used as a safer alternative to circumvent serious glucocorticoid related side effects. Conventional eye drops are the most convenient dosage form to deliver drugs to the ocular surface. However, poor drug aqueous solubility often raises technical issues. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions are an effective approach to formulate poorly soluble drugs in the form of conventional eye drop dosage form. After application, nanoemulsion mixes with the tear film, whereupon its breakdown occurs. The drug is released in the tear film and becomes available for absorption, the aqueous phase merges with the aqueous component of the tear film, the lipid phase replenishes the tear film lipid layer and serves as a depot of the unreleased drug portion, while the surfactants increase tear film stability interacting with ocular surface mucins and polar lipids in the tear film lipid layer. The nanoemulsion performance can further be improved by making its droplets positively charged. Such cationic nanoemulsions are assumed to possess prolonged contact with the application site, interacting with negatively charged ocular surface mucins. For cationic nanoemulsion preparation cationic agents, such as cationic lipid stearylamine or positively charged polysaccharide chitosan, have to be used. The cationic nanoemulsion approach could reduce dosing frequency and improve patient compliance.

The aim of this doctoral thesis is development of functional, cationic nanoemulsions specifically designed to assure effective dry eye symptom relief and, at the same time, to serve as carriers of poorly soluble drugs (ibuprofen and rebamipide) intended for DED treatment.

Methods: Primary cationic nanoemulsions with stearylamine and secondary cationic nanoemulsions with chitosan were both prepared with high-energy method using microfluidizer (1000 bar, 5 or 10 homogenization cycles). Lecithin Lipoid S 45, whose components are naturally present in the normal tear film, was used as anionic surfactant to enable coating of the droplets with chitosan by electrostatic interaction. The solubility of ibuprofen and rebamipide in the chosen oils (castor oil, Miglyol[®] 812, sesame and soybean oil) or oil phase (solution of lecithin in Miglyol[®] 812) was tested at room temperature by ultra performance liquid chromatography (UPLC). The nanoemulsion droplet size and PDI were determined by dynamic light scattering, and the zeta-potential by electrophoretic light scattering. The drug entrapment efficiency was assessed by ultrafiltration, followed by UPLC analysis. The nanoemulsions were further characterized in terms of pH, osmolarity by freezing point depression method, viscosity as the function of the applied shear and surface tension by Du Noüy ring method. The nanoemulsion stability was tested after real-time storage (at 25 or 4 °C) and after special thermodynamic (heating-cooling cycles and freeze-thaw cycles) and kinetic (centrifugation) stability tests by measuring droplet size, PDI, zeta-potential and pH. The nanoemulsion sterilizability by autoclaving (121 °C / 20 minutes) or filtration (0.2 µm) was also determined. The ibuprofen *in vitro* release was tested by dialysis bag method, using pharmacopoeia apparatus with rotating paddle, followed by UPLC analysis. The potential for prolonged residence time at the ocular surface (i.e. mucoadhesion) was assessed after nanoemulsion mixing with mucin dispersion, by measuring a subsequent change in droplet size and zeta-potential or a subsequent change in viscosity as the function of the applied shear. The biocompatibility of nanoemulsions was tested on two different *in vitro* models (namely 2D and 3D HCE-T model), with the aid of MTT assay, and on an *ex vivo* model of porcine cornea, using fluorescein solution to visualize corneal damage, which was specially developed within this doctoral thesis.

Results: Primary cationic nanoemulsions were prepared with Miglyol[®] 812 (5 %, w/w), Kolliphor[®] EL (2.5 %, w/w), glycerol (2.5 %, w/w), purified water (up to 100 %, w/w) and increasing weight fraction of stearylamine (0.01-0.3 %, w/w). The nanoemulsions are characterized with small droplet size (81.0-95.6 nm), low PDI (0.139-0.251) and positive zeta-potential (3.1-25.5 mV). The nanoemulsions are further characterized with pH acceptable for ophthalmic use, low viscosity and Newtonian behaviour. The surface tension of the nanoemulsions with more than 0.05 % (w/w) stearylamine falls below 35 mN m⁻¹, which could have a negative impact on patient comfort upon application. All the nanoemulsions are stable after 5-month storage at 4 °C, showing only minor changes in their physico-chemical properties.

The interactions between the nanoemulsions and mucin were proven by size and zeta-potential measurement. However, more prominent mucin interactions were not observed when the stearylamine weight fraction was increased above 0.05 % (w/w). The biocompatibility studies performed on 2 different HCE-T models point out the 3D model as more appropriate, showing good nanoemulsion biocompatibility (viability ≥ 90 %), which is in accordance with previously published stearylamine nanoemulsion toxicity results obtained on different *in vivo* models.

Secondary cationic nanoemulsions were prepared using low (NC1; 0.05 %, w/w) and high (NC2: 0.3 %, w/w) weight fraction of chitosan, Miglyol[®] 812 (2.5 %, w/w), lecithin (0.05 %, w/w), Kolliphor[®] EL (0.25 %, w/w), glycerol (2.5 %, w/w) and purified water (up to 100 %, w/w). The nanoemulsions are characterized with droplet size of around 180 nm, PDI below 0.2 and positive zeta-potential (18.7 and 30 mV). The NC1 formulation showed remarkable stability after all the tests performed, while the NC2 formulation turned out to be less stable after 30-day storage at 25 °C and thermodynamic stability tests. Ibuprofen (0.2 %, w/w) was successfully incorporated in both formulations rendering high entrapment efficiency (> 98 %). Since rebamipide turned out to be completely or almost insoluble in all the oils tested, it was not further considered for nanoemulsion incorporation. The addition of ibuprofen did not have a big influence on the formulation droplet size and PDI, but an increase in zeta-potential was observed (24.6 and 36.8 mV). The formulations are further characterized with low viscosity and Newtonian behaviour, osmolarity within a normal tear film osmolarity range and surface tension around 35 mN m⁻¹. The formulation pH is around 4.4, which is still acceptable for ophthalmic application, since no buffers are used. The formulation with low chitosan weight fraction (INC1) shows higher stability than the formulation INC2 after 30-day storage at 4 °C. While autoclaving had a negative impact on the formulation stability, filtration turned out to be an appropriate technique for sterilization of the prepared nanoemulsions. After 2 hours about 90 % of ibuprofen was released from both formulations, which is significantly faster than from ibuprofen oil solution and suspension. Such a release profile could be beneficial, regarding limited residence time on the ocular surface. Rheological characterization after mixing with mucin dispersion showed significant mucoadhesive properties of both INC1 and INC2 formulations. However, no increase in formulation mucoadhesive properties was observed with higher chitosan weight fraction. Formulation biocompatibility was tested on 3D HCE-T model and *ex vivo* model of porcine cornea. The viability of the cellular model after 30-minute exposure to the formulations was high (≥ 88 %). However, NC2 and INC2 formulations showed very small, but statistically significant viability decrease, which can be attributed to the higher chitosan weight fraction. Similar results were obtained on the *ex vivo* model. While there was

no corneal damage observed after exposure to the formulation INC1, a slight corneal damage was detected after 15-minute incubation with the formulation INC2. The damage was, however, notably milder than the damage caused by benzalkonium chloride in the highest concentration used in marketed eye drops.

Conclusion: The research performed within this doctoral thesis confirms the potential of both primary cationic nanoemulsions with stearylamine and secondary cationic nanoemulsions with chitosan in the treatment of DED. The results point out the nanoemulsion with 0.05 % (w/w) stearylamine and 0.05 % (w/w) chitosan-coated nanoemulsion as the lead formulations characterized by prominent mucoadhesive properties, achieved at minimal cationic agent weight fraction, which increases their potential to be well tolerated after application. These functional cationic nanoemulsions could be effectively used as drug-free vehicles for symptomatic DED treatment or as a technological platform for incorporation of lipophilic drugs used to treat DED.

Keywords: cationic nanoemulsion, dry eye disease, stearylamine, chitosan, lecithin, ibuprofen, 3D HCE-T model, porcine cornea

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. POVRŠINA OKA.....	2
1.1.1. Epitel rožnice	2
1.1.2. Epitel bulbarne spojnice.....	2
1.1.3. Suzni film.....	3
1.2. BOLEST SUHOG OKA.....	4
1.2.1. Podjela bolesti suhog oka.....	5
1.2.2. Mehanizam bolesti suhog oka.....	6
1.2.3. Liječenje bolesti suhog oka.....	8
1.2.4. Umjetne suze.....	11
1.2.5. Farmakoterapija	11
1.2.6. Konvencionalni topikalni farmaceutski oblici za liječenje bolesti suhog oka i njihovi nedostaci	14
1.2.7. Inovativni terapijski nanosustavi za liječenje bolesti suhog oka	15
1.3. NANOEMULZIJE ZA LIJEČENJE BOLESTI SUHOG OKA.....	16
1.3.1. Sudbina nanoemulzija nakon topikalne oftalmičke primjene.....	17
1.3.2. Pomoćne tvari u pripravi nanoemulzija za oftalmičku primjenu.....	19
1.3.2.1. Uljna faza	20
1.3.2.2. Površinski aktivne tvari	20
1.3.2.3. Nositelji pozitivnog naboja	20
1.3.2.4. Konzervansi.....	21
1.3.2.5. Tvari za povećanje viskoznosti	22
1.3.2.6. Ostale pomoćne tvari.....	22
1.3.3. Metode pripreme nanoemulzija	23
1.3.3.1. Visokoenergetske metode	24
1.3.3.1.1. Visokotlačna homogenizacija	24
1.3.3.1.2. Mikrofluidizacija.....	25
1.3.3.1.3. Ultrasonikacija	26
1.3.3.2. Niskoenergetske metode	26
1.3.3.2.1. Metoda spontanog emulgiranja	28
1.3.3.2.2. Metode inverzije faza	28
1.3.3.2.2.1. Metoda inverzije faza uslijed promjene temperature	28
1.3.3.2.2.2. Metoda inverzije faza uslijed promjene sastava.....	29
1.3.4. Sterilizacija nanoemulzija	29

1.3.5. Stabilnost nanoemulzija	30
1.3.5.1. Nanoemulzije, makroemulzije i mikroemulzije	30
1.3.5.2. Mehanizmi destabilizacije nanoemulzija	31
1.3.6. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija.....	33
1.3.6.1. Raspodjela veličina kapljica.....	33
1.3.6.2. Zeta-potencijal.....	34
1.3.6.3. pH.....	35
1.3.6.4. Viskoznost.....	35
1.3.6.5. Osmolarnost	35
1.3.6.6. Površinska napetost.....	36
1.3.6.7. Učinkovitost uklapanja djelatne tvari.....	36
1.3.7. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija.....	37
1.3.8. Biofarmaceutska karakterizacija nanoemulzija	37
1.3.8.1. Ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene nanoemulzija	37
1.3.8.1.1. <i>In vitro</i> modeli.....	38
1.3.8.1.2. <i>Ex vivo</i> modeli.....	39
1.3.8.1.3. Ostali organotipski modeli	40
1.3.8.2. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja djelatnih tvari iz nanoemulzija	41
1.3.8.3. Ispitivanje permeabilnosti djelatnih tvari iz nanoemulzija	41
1.3.8.4. Ispitivanje mukoadhezivnosti nanoemulzija	43
1.3.8.4.1. Ispitivanje vlačne čvrstoće	43
1.3.8.4.2. Metoda s protočnom ćelijom.....	44
1.3.8.4.3. Mikroskopija atomskih sila	44
1.3.8.4.4. Reološke metode	44
1.3.8.4.5. Ispitivanje mukoadhezivnosti mjerenjem zeta-potencijala i veličine kapljica	45
1.3.8.4.6. Ispitivanje mukoadhezivnosti na staničnim kulturama	45
2. OBRAZLOŽENJE TEME	46
3. MATERIJALI I METODE	49
3.1. MATERIJALI.....	50
3.2. METODE.....	51
3.2.1. Priprava nanoemulzija	51
3.2.1.1. Primarni probir ulja i površinski aktivnih tvari.....	51
3.2.1.2. Priprava primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom	51
3.2.1.3. Priprava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	51
3.2.1.3.1. Probir udjela lecitina i Kolliphor®-a EL.....	51
3.2.1.3.2. Optimizacija procesnih parametara	52

3.2.1.3.3. Probir tipa i udjela kitozana te metode za pripravu sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	52
3.2.2. Ispitivanje topljivosti ibuprofena	52
3.2.3. Uklapanje ibuprofena u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom	53
3.2.4. Ispitivanje topljivosti rebamipida	53
3.2.5. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija.....	53
3.2.5.1. Mjerenje veličine kapljica, raspodjele veličina kapljica i zeta-potencijala.....	53
3.2.5.2. Mjerenje pH, osmolarnosti, viskoznosti i površinske napetosti.....	54
3.2.5.3. Morfološka karakterizacija nanoemulzija	54
3.2.5.4. Ispitivanje učinkovitosti uklapanja ibuprofena	55
3.2.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija.....	55
3.2.7. Sterilizacija nanoemulzija	56
3.2.8. Ispitivanje <i>in vitro</i> oslobađanja ibuprofena.....	56
3.2.9. Određivanje sadržaja ibuprofena	56
3.2.10. Određivanje sadržaja rebamipida.....	57
3.2.11. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija.....	58
3.2.11.1. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija reološkom metodom..	58
3.2.11.2. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala.....	58
3.2.12. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija.....	59
3.2.12.1. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija <i>in vitro</i>	59
3.2.12.1.1. Uvjeti uzgoja stanica	59
3.2.12.1.2. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija na 2D HCE-T modelu.....	59
3.2.12.1.3. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija na 3D HCE-T modelu.....	60
3.2.12.2. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija <i>ex vivo</i>	61
3.2.13. Statistička analiza.....	62
4. REZULTATI I RASPRAVA	64
4.1. RAZVOJ PRIMARNIH KATIONSКИH NANOEMULZIJA SA STEARILAMINOM	65
4.1.1. Primarni probir ulja i neionskih površinski aktivnih tvari	65
4.1.2. Fizičko-kemijska svojstva pripremljenih primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom.....	71
4.1.3. Stabilnost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom	73
4.1.4. Interakcija primarnih kationskih nanoemulzija s mucinom.....	76
4.1.5. Ispitivanje biokompatibilnosti primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom	78
4.2. RAZVOJ SEKUNDARNIH KATIONSКИH NANOEMULZIJA S KITOZANOM....	80

4.2.1. Odabir uljne faze i površinski aktivnih tvari.....	81
4.2.1.1. Probir udjela lecitina	83
4.2.1.2. Probir udjela Kolliphor [®] -a EL.....	84
4.2.2. Optimizacija procesnih parametara.....	85
4.2.3. Priprava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom.....	90
4.2.4. Morfološka karakterizacija sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	93
4.2.5. Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	94
4.2.6. Uklapanje ibuprofena u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom	98
4.2.7. Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom s uklopljenim ibuprofenom.....	102
4.2.8. Sterilizacija	103
4.2.9. Oslobađanje ibuprofena <i>in vitro</i>	107
4.2.10. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom.....	109
4.2.11. Ispitivanje biokompatibilnosti sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom	110
4.2.11.1. Ispitivanje biokompatibilnosti <i>in vitro</i>	111
4.2.11.2. Ispitivanje biokompatibilnosti <i>ex vivo</i>	112
5. ZAKLJUČCI.....	115
5.1. PRIMARNE KATIONSKE NANOEMULZIJE SA STEARILAMINOM	116
5.2. SEKUNDARNE KATIONSKE NANOEMULZIJE S KITOZANOM	117
6. LITERATURA.....	119
ŽIVOTOPIS	137

1. UVOD

1.1. POVRŠINA OKA

Površina koja je kod otvorenog oka izložena zraku sastoji se od epitela rožnice i epitela bulbarne spojnice koje prekriva tanak sloj suznog filma (1).

1.1.1. Epitel rožnice

Rožnica je transparentna avaskularna struktura ovalnog oblika kroz koju prolazi svjetlost na putu do mrežnice u procesu vida. Horizontalni promjer rožnice iznosi približno 11,5 mm, a vertikalni 10,5 mm. Rožnica je građena od 5 histološki različitih slojeva: epitela, Bowmannove membrane, strome, Descemetove membrane i endotela. Epitel rožnice sastoji se od 4 do 6 slojeva nekeratiniziranih epitelnih stanica, a njegova debljina iznosi približno 50 μm . Stanice epitela u prva 2-3 površinska sloja prekrivene su mikrovilima i mikroplikama na apikalnoj strani, što povećava ukupnu površinu koja je u kontaktu sa suznim filmom. Stanice u površinskim slojevima epitela međusobno su povezane čvrstim spojevima (engl. *tight junctions*) koji su odgovorni za snažna barijerna svojstva rožnice, sprječavajući prolaz tekućine i patogena. Između epitelnih stanica granaju se živčani završeci, stoga je rožnica posebno osjetljiva na bol. Epitelne stanice rožnice normalno podliježu deskvamaciji, a nove epitelne stanice nastaju diobom matičnih stanica koje se nalaze na rubu (lat. *limbus*) rožnice. Prosječan životni vijek epitelnih stanica rožnice iznosi 7-10 dana. Zahvaljujući značajnoj sposobnosti regeneracije, nakon ozljede epitelnog sloja na rožnici ne nastaju ožiljci, kao ni zamućenja koja mogu ometati proces vida (2, 3).

1.1.2. Epitel bulbarne spojnice

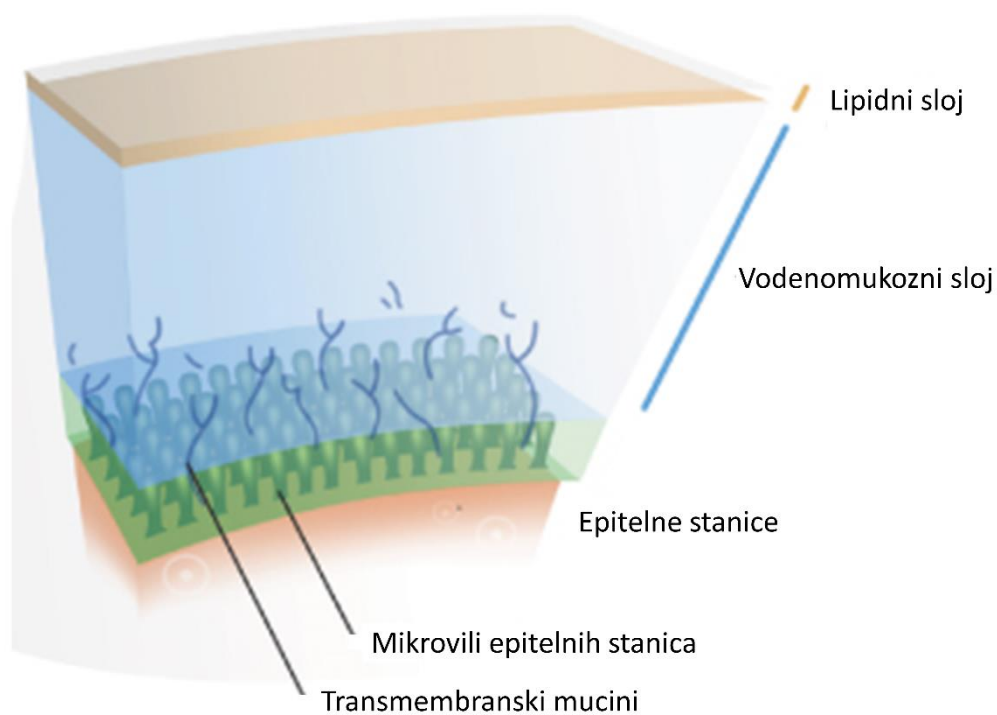
Bulbarna spojnica prekriva prednji dio bjeloočnice do ruba rožnice. Sastoji se od sloja epitela, bazalne membrane i izrazito prokrvljene lamine proprije. Epitel bulbarne spojnice sastoji se od 6 ili više slojeva nekeratiniziranih epitelnih stanica, pri čemu su stanice površinskog sloja, kao i kod epitela rožnice, prekrivene mikrovilima i mikroplikama na apikalnoj strani. U površinskom sloju epitelne stanice međusobno su povezane čvrstim spojevima, što pridonosi barijernim svojstvima spojnice. Ipak, barijerna svojstva epitela spojnice slabija su od barijernih svojstava epitela rožnice. Epitel spojnice sadrži i vrčaste stanice koje izlučuju mucine (1, 4). Mucini su glikoproteini velike molekulske mase koji sadrže jednu ili više proteinskih domena bogatih aminokiselinama serinom i treoninom, na koje su kovalentno vezani postranični oligosaharidni lanci (glikani). Maseni udio glikana u ukupnoj masi mucina iznosi čak 50-80 %

(5). Vrčaste stanice pojedinačno su umetnute između epitelnih stanica te čine 5-10 % ukupnog broja stanica epitela bulbarne spojnice (1, 4).

1.1.3. Suzni film

Suzni film prekriva površinu oka čineći ju vlažnom i glatkom te predstavlja prvu refrakcijsku površinu u procesu vida. Nužan je za prehranu avaskularne rožnice difuzijom bitnih nutrijenata, štiti oko od trenja tijekom treptanja te predstavlja prvu liniju obrane površine oka od bakterija, zahvaljujući antibakterijskom djelovanju lizozima (5, 6). Novija istraživanja predlažu dvoslojni model suznog filma, u kojem vodenomukozni sloj gela (2-6 μm) čini najveći dio suznog filma i u izravnom je kontaktu s površinom oka (epitelom rožnice i spojnice). Vrlo tanak lipidni sloj suznog filma (oko 42 nm) prekriva vodenomukozni gel te je kod otvorenog oka u izravnom kontaktu sa zrakom (5). Model suznog filma prikazan je slikom 1. Vodenu komponentu suznog filma izlučuju suzne žlijezde. Vrčaste stanice spojnice oka izlučuju sekretorne mucine koji se dijele na velike mucine koji tvore gel (engl. *gel-forming mucins*) i male topljive mucine koji ne posjeduju sposobnost stvaranja gela (engl. *non-gel forming mucins*). Mucini koji tvore gel iznimno su velike molekulske mase (do 40 MDa) te na sebe mogu vezati velike količine vode. Zajedno s vodenom komponentom suznog filma i malim topljivim mucinima koji ne posjeduju sposobnost stvaranja gela tvore vodenomukozni gel s gradijentom koncentracije mucina koja se smanjuje s udaljenošću od epitelnih stanica površine oka. Mucini koji tvore gel bitni su za stabilizaciju i širenje suznog filma po površini oka (1, 5). Transmembranske mucine izlučuju epitelne stanice rožnice i spojnice oka te suzne žlijezde. Transmembranski mucini vezani su za apikalni dio stanične membrane površinskih epitelnih stanica rožnice i spojnice tvoreći glikokaliks. Glikokaliks pridonosi povećanju polarnosti površine oka, čime se poboljšavaju svojstva močenja površine oka i širenje suznog filma. Uloga sekretornih i transmembranskih mucina je i zaštita oka od patogena jer tvore barijeru penetraciji i vezanju patogena za epitelne stanice površine oka (5). Lipidni sloj suznog filma uglavnom potječe od lipofilnog meibuma koji izlučuju Meibomove žlijezde smještene na rubovima vjeđa. Nakon izlučivanja meibum se po površini suznog filma jednolično širi treptanjem. Taj vrlo tanak površinski sloj smanjuje površinsku napetost suznog filma, omogućujući poboljšano širenje suznog filma po površini oka i njegovu stabilizaciju, usporava isparavanje vodene komponente suznog filma te sprječava prelijevanje suza preko rubova vjeđa (5–7). Smatra se da se lipidni sloj suznog filma sastoji od tankog sloja polarnih lipida (2-9 nm) koji priliježe uz vodenomukozni gel te od debljeg sloja nepolarnih lipida (33-40 nm) na samoj površini koji tvori najmanje oko 80 % ukupne debljine lipidnog sloja suznog filma (7). Najzastupljeniji polarni lipidi su fosfolipidi (fosfatidilkolin,

lizofosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, lizofosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, sfingomijelin i ceramidi) kojih u suzama ukupno ima 5-13 %. Zanimljivo je da meibum sadrži najviše 0,1 % fosfolipida te još uvijek ne postoji objašnjenje o porijeklu fosfolipida u suznom filmu. (O-acil)- ω -hidroksimasne kiseline (OAHFAs) najzastupljeniji su polarni lipidi meibuma (4 %) te su također sastavni dio lipidnog sloja suznog filma. Napolarni lipidi suznog filma potječu iz meibuma, a to su većinom esteri kolesterola i voštani esteri (5, 7). Kod normalnog, zdravog suznog filma prisutna je interakcija lipidnog sloja i vodenomukoznog gela koja pridonosi stabilizaciji suznog filma (5, 8).



Slika 1. Struktura suznog filma (preuzeto i prilagođeno iz reference (9)).

1.2. BOLEST SUHOG OKA

Bolest suhog oka pogađa stotine milijuna ljudi širom svijeta i jedan je od najčešćih razloga za posjet oftalmologu. Umjereni do teški oblici bolesti suhog oka uzrokuju bol, ograničavaju pacijente u obavljanju svakodnevnih aktivnosti, narušavaju vitalnost i opće zdravstveno stanje te su česti uzrok depresije (10). Prema najnovijoj definiciji, bolest suhog oka je multifaktorijalna bolest površine oka koju karakterizira gubitak homeostaze suznog filma, a

koja je popraćena očnim simptomima čija je etiologija povezana s nestabilnošću i hiperosmolarnošću suznog filma, upalom i oštećenjem površine oka te neurosenzornim abnormalnostima (11). Sam pojam multifaktorijalna bolest podrazumijeva značajan i složen funkcionalni poremećaj koji nije moguće opisati samo jednim procesom, znakom ili simptomom (10). Simptomi bolesti su nespecifični i uključuju crvenilo, peckanje, suženje, svrbež, osjećaj suhoće i pijeska ili stranog tijela u oku te prolazno zamućenje vida (11, 12). Postoje slučajevi kada pacijent osjeća sve ili samo neke od simptoma bolesti suhog oka, dok klinički znakovi nisu prisutni, no moguća je i obrnuta situacija (11). Globalna prevalencija bolesti suhog oka razlikuje se ovisno o geografskom području te u prosjeku iznosi 5-50 %, a postoje istraživanja koja pokazuju učestalost u određenim populacijama do čak 75 % (13). Rizik za razvoj bolesti povezan je s dobi te se značajno povećava nakon 50-te, a posebice nakon 80-te godine života. Ipak, zbog današnjeg modernog načina života, koji uključuje dugotrajan rad na računalu, prekomjernu upotrebu pametnih telefona, boravak u klimatiziranim prostorima niske relativne vlažnosti zraka, nošenje kontaktnih leća i sl., učestalost bolesti sve je veća i kod mlađe populacije. Ženski spol također je povezan s povećanim rizikom za razvoj bolesti suhog oka. Poznato je da androgeni stimuliraju rad suznih i Meibomovih žlijezda te postoje brojni dokazi da je niska razina androgena i visoka razina estrogena bitan faktor rizika za razvoj bolesti suhog oka, stoga je rizik značajno povećan kod žena u postmenopauzi koje primaju hormonsku nadomjesnu terapiju (14). Povećan rizik za razvoj bolesti povezan je i sa žutom rasom kod koje je učestalost 1,5-2,2 puta veća u odnosu na bijelu rasu. Kod osoba koje nose kontaktne leće rizik je povećan i do 4 puta (13).

1.2.1. Podjela bolesti suhog oka

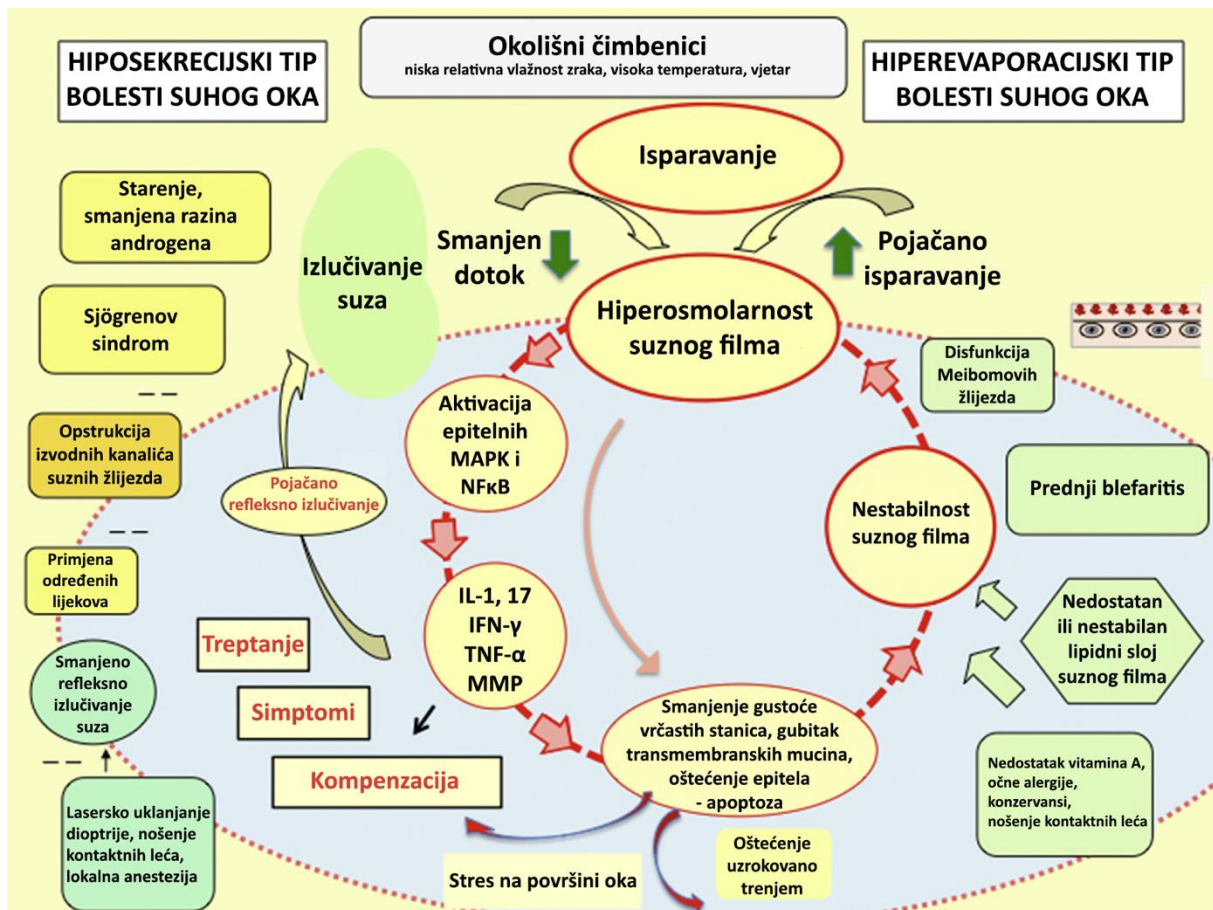
Bolest suhog oka dijeli se na dva glavna etiopatogenetska tipa: hiposekrecijski tip, koji nastaje uslijed smanjenog izlučivanja suza, i hiperevaporacijski tip, koji nastaje uslijed prekomjernog isparavanja suza (1). Hiposekrecijski tip pokazuje manju učestalost u populaciji od hiperevaporacijskog tipa te može biti posljedica Sjögrenovog sindroma te drugih poremećaja, stanja ili bolesti, poput starenja, ablacije suznih žlijezda, opstrukcije izvodnih kanalića suznih žlijezda, nošenja kontaktnih leća, laserskog uklanjanja dioptrije, ozljede trigeminalnog živca, transplantacije rožnice i dijabetesa, ili može nastati kao nuspojava određenih lijekova (1, 12). Sjögrenov sindrom je autoimuna bolest koja pogađa egzokrine žlijezde, od kojih su najviše zahvaćene suzne žlijezde i žlijezde slinovnice. Propadanje spomenutih žlijezda uzrok je simptoma bolesti suhog oka i suhoće usta. Kod pacijenata sa Sjögrenovim sindromom bolest suhog oka javlja se u ranijoj životnoj dobi, a karakterizira ju brže napredovanje i teži oblici

bolesti (1). Starenje je najčešći uzrok hiposekrecijskog tipa bolesti suhog oka, a smatra se da nastaje zbog starenja i opadanja funkcije suznih žlijezda te smanjenja osjetljivosti rožnice na vanjske podražaje, što smanjuje refleksno izlučivanje suza (1). Učestaliji hiperevaporacijski tip bolesti suhog oka najčešće je posljedica disfunkcije Meibomovih žlijezda, a može nastati i zbog poremećaja zatvaranja vjeđa, smanjene učestalosti treptanja (zbog, primjerice, Parkinsonove bolesti), očnih alergija, nedostatka vitamina A te topikalne oftalmičke primjene određenih lijekova (1). Disfunkcija Meibomovih žlijezda nastaje zbog patoloških promjena na žlijezdama koje mogu biti ireverzibilne. Opstrukcija Meibomovih žlijezda najčešći je uzrok njihove disfunkcije, a može biti posljedica kožnih bolesti poput rozaceje, atopijskog ili seboroičnog dermatitisa, psorijaze ili ihtioze te opstrukcije izvodnih kanalića žlijezda ožiljkastim tkivom na spojnici ili hiperkeratinizacijom i pojačanim ljuštenjem stanica koje oblažu unutrašnjost (lumen) izvodnih kanalića žlijezda, što može biti popraćeno povećanom viskoznošću meibuma. Također, upotreba tretinoina u liječenju akne može uzrokovati atrofiju i posljedičnu disfunkciju Meibomovih žlijezda. U početnim stadijima hiperevaporacijskog tipa bolesti suhog oka normalan volumen suznog filma moguće je nadoknaditi pojačanim izlučivanjem suza (1).

1.2.2. Mehanizam bolesti suhog oka

Hiperosmolarnost suznog filma u središtu je patogeneze bolesti suhog oka, a posljedica je smanjenog izlučivanja odnosno prekomjernog isparavanja suza. Osmolarnost normalnog suznog filma iznosi približno $302 \pm 8 \text{ mOsm kg}^{-1}$, dok kod blagog do umjerenog i teškog oblika suhog oka iznosi oko $315 \pm 10 \text{ mOsm kg}^{-1}$ i $336 \pm 22 \text{ mOsm kg}^{-1}$ (1). Ipak, smatra se da je na određenim mjestima na površini oka, a posebice na mjestima pucanja suznog filma, osmolarnost daleko veća. Hiperosmolarnost suznog filma oštećuje površinu oka neposrednim, ali i posrednim mehanizmima preko kaskade upalnih reakcija. Upala uzrokuje apoptozu epitelnih stanica površine oka i vrčastih stanica spojnice, abnormalnu diferencijaciju te pojačanu deskvamaciju epitelnih stanica, što pridonosi nestabilnosti suznog filma. Rana aktivacija signalnih putova mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) i nuklearnog čimbenika κB (NF κB) potiče kaskadu upalnih reakcija koje potiču sintezu i lučenje proupalnih citokina, čimbenika nekroze tumora α (TNF- α), metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa i proapoptotičkih čimbenika. Metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa su proteolitički enzimi koji sudjeluju u procesu cijeljenja rane i upale, a kod bolesti suhog oka razgrađuju čvrste spojeve između epitelnih stanica te pridonose narušavanju integriteta epitelne barijere na površini oka. Smatra se da metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa MMP-9, koja razgrađuje okludin (podjedinicu čvrstih spojeva između stanica), ima ključnu ulogu u bolesti suhog oka te

je dokazana povezanost između koncentracije MMP-9 u suznom filmu i težine bolesti (1). Kaskada upalnih reakcija dodatno privlači upalne stanice (makrofage, dendritičke stanice, neutrofile, prirodne stanice ubojice i aktivirane T limfocite) na površinu oka koje tada postaju dodatni izvor medijatora upale. Medijatori upale i hiperosmolarnost suznog filma smanjuju ekspresiju transmembranskih mucina te uzrokuju apoptozu epitelnih stanica rožnice i spojnice te vrčastih stanica spojnice (1). Manjak vrčastih stanica karakterističan je za bolest suhog oka, a očituje se smanjenom koncentracijom mucina koji tvore gel u suznom filmu, što u kombinaciji s promjenama na glikokaliksi značajno narušava stabilnost suznog filma i močenje površine oka te je uzrok preuranjenog pucanja suznog filma (1). Preuranjeno pucanje suznog filma uzrok je narušene vidne funkcije. Navedeni događaji upotpunjuju tzv. začarani krug bolesti suhog oka, prikazan slikom 2, koji omogućuju samoodržavanje bolesti. Upala također uzrokuje kroničnu neurogenu upalu pojačavajući ozbiljnost same bolesti. Zbog nedostatne podmazanosti površine oka suznim filmom, koja je rezultat gubitka mucina ili smanjenog volumena suza, pojačano je trenje između vjeđa i površine oka za vrijeme treptanja. Pojačano trenje može dodatno mehanički oštetiti određena područja na površini oka. Filamentozni keratitis može se javiti kao posljedica bolesti suhog oka, a uključuje stanje kod kojega se ogranci epitela rožnice dugački do 2 mm pružaju u suzni film. Povlačenje ogranaka pri treptanju uzrok je jake boli i osjećaja stranog tijela u oku (1).



Slika 2. Začarani krug bolesti suhog oka; MAPK – mitogenom aktivirane protein kinaze; NFκB – nuklearni čimbenik κB; IL – interleukini; IFN-γ – interferon γ; TNF-α – čimbenik nekroze tumora α; MMP – metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa (uz dozvolu Elsevier-a preuzeto i prilagođeno iz reference (1)).

1.2.3. Liječenje bolesti suhog oka

Teški oblici neliječene bolesti suhog oka mogu prouzročiti oštećenje i ulceraciju rožnice te stvaranje ožiljaka na rožnici i trajno oštećenje vida (15). Liječenje bolesti suhog oka vrlo je složeno zbog multifaktorijalne etiologije. Identifikacija uzroka, dominantnog tipa (hiposekrecijskog ili hiperevaporacijskog) i stupnja bolesti suhog oka od ključne je važnosti za pravilno liječenje. Kod većine pacijenata postoji povezanost između težine simptoma i kliničkih znakova bolesti. U slučajevima kada su kronično prisutni simptomi bolesti suhog oka, uz ograničene kliničke znakove otporne na liječenje, liječenje bi trebalo biti usmjereno na liječenje neuropatske boli. Kod pacijenata koji pak imaju blage simptome, uz jasne kliničke znakove bolesti, najvjerojatnije je u pitanju smanjena osjetljivost rožnice čiji je uzrok neuropatska keratopatija, stoga je liječenje od kritične važnosti za prevenciju daljnjih oštećenja (15). Krajnji cilj liječenja bolesti suhog oka je ponovno uspostavljanje homeostaze na površini oka prekidom

začaranog kruga bolesti te uvođenje dugotrajnih mjera kojima bi se spriječio relaps. Algoritam liječenja prikazan u tablici 1 uzima u obzir etiologiju i stupanj bolesti te počinje s općenitim mjerama za liječenje bolesti suhog oka miješane etiologije koje zatim postaju sve usmjerenije na liječenje specifičnih uzroka, znakova i simptoma bolesti. U slučajevima kada postoje dokazi ozbiljnijih komplikacija bolesti povezanih s, primjerice, poremećajem vjeđa, neovaskularizacijom rožnice ili infekcijom mikroorganizmima, potrebno je razmotriti dodatne pristupe liječenju (15).

Tablica 1. Algoritam liječenja bolesti suhog oka (uz dozvolu *Elsevier*-a preuzeto iz reference (15)).

<p>Korak 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edukacija o samoj bolesti, liječenju i prognozama liječenja • Uvođenje promjena u lokalnom okruženju • Edukacija o promjenama u prehrani (uključujući dodatke prehrani s esencijalnim masnim kiselinama) • Identifikacija i razmatranje ukidanja lijekova (sistemskih ili topikalnih) koji su mogući uzrok bolesti • Primjena umjetnih suza (ako je prisutna disfunkcija Meibomovih žlijezda, razmotriti primjenu umjetnih suza koje sadrže lipide) • Higijena vjeđa i primjena toplih kompresa
<p>Korak 2:</p> <p>Ako su pristupi liječenju opisani u prethodnom koraku nedovoljni, razmotriti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Umjetne suze bez konzervansa radi izbjegavanja mogućeg toksičnog učinka konzervansa na površinu oka • Eterično ulje čajevca ako je prisutna infekcija demodeksom • Zadržavanje suza zatvaranjem suznih kanalića ili nošenjem posebnih naočala koje sprječavaju isparavanje suza • Primjenu masti za oko prije spavanja ili nošenje posebnih naočala koje sprječavaju isparavanje suza tijekom noći • Fizičko zagrijavanje (primjenom toplih kompresa ili posebnih uređaja) i istiskivanje sadržaja Meibomovih žlijezda tijekom dana • Primjenu intenzivnog pulsirajućeg svjetla (engl. <i>intense pulsed light</i>, IPL) pomoću posebnih uređaja tijekom dana, kod disfunkcije Meibomovih žlijezda • Propisivanje lijekova za liječenje bolesti suhog oka: <ul style="list-style-type: none"> ○ Topikalnih antibiotika s ili bez glukokortikoida za primjenu na rubove vjeđa ako je prisutan prednji blefaritis ○ Topikalnih glukokortikoida (kratkotrajna primjena) ○ Topikalnih sekretogoga ○ Topikalnih nesteroidnih imunomodulatora, poput ciklosporina A ○ Topikalnih antagonista integrina, poput lifitegrasta ○ Oralnih makrolida ili tetraciklina
<p>Korak 3:</p> <p>Ako su pristupi liječenju opisani u prethodnim koracima nedovoljni, razmotriti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Primjenu oralnih sekretogoga • Topikalnu primjenu autolognog seruma • Primjenu posebnih kontaktnih leća
<p>Korak 4:</p> <p>Ako su pristupi liječenju opisani u prethodnim koracima nedovoljni, razmotriti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Topikalnu primjenu glukokortikoida tijekom duljeg razdoblja • Presađivanje amniotske membrane (kod kroničnih oštećenja epitela površine oka koja ne zacjeljuju) • Kirurško (trajno) zatvaranje suznih kanalića • Ostale kirurške mogućnosti liječenja (npr. tarzorafiju ili (auto)transplantaciju žlijezda slinovnica)

1.2.4. Umjetne suze

Prva linija liječenja bolesti suhog oka najčešće uključuje topikalnu primjenu bezreceptnih kapi za oko, tzv. umjetnih suza. Pojam umjetne suze uključuje širok spektar proizvoda čiji je cilj nadomjestiti prirodni suzni film (16). Najzastupljenija tvar u umjetnim suzama je voda kojom se nastoji nadomjestiti vodenu komponentu suznog filma. S ciljem produljivanja zadržavanja pripravka na površini oka umjetnim se suzama dodaju različite tvari za povećanje viskoznosti, poput derivata celuloze (karboksimetilceluloza, hidroksipropilmetilceluloza, hidroksipropilceluloza), prirodnog glikozaminoglikana hijaluronske kiseline ili galaktomanana hidroksipropilguara koji gelira nakon primjene na oko zbog promjene pH. Danas se sve veći značaj pridaje umjetnim suzama koje sadrže lipide, kojima se nastoji nadomjestiti lipidni sloj suznog filma. Od lipida u komercijalno dostupnim kapima za oko koriste se tekući parafin, ricinusovo ulje, trigliceridi srednje duljine lanaca, sojino ulje i fosfolipidi (15, 17, 18). Umjetne suze s lipidima tehnološkog su oblika (nano)emulzija, a postoje i sprejevi za oko koji sadrže liposome (15). Sprejevi za oko s liposomima primjenjuju se na zatvoreno oko. Nakon primjene liposomi migriraju u suzni film preko rubova vjeđa gdje nadomještaju fosfolipide lipidnog sloja suznog filma, povećavajući pritom debljinu lipidnog sloja i stabilnost suznog filma (19). Ipak, iako je primjenom umjetnih suza moguće ublažiti simptome bolesti suhog oka, još uvijek nije poznato pružaju li različite komercijalno dostupne umjetne suze podjednako olakšanje znakova i simptoma bolesti kada se uspoređuju međusobno ili s placebom (16). Također, primjena umjetnih suza je samo simptomatski oblik liječenja jer ne djeluje na uzrok bolesti suhog oka (15).

1.2.5. Farmakoterapija

Dok je kod blagog oblika bolesti suhog oka primjena umjetnih suza dovoljna, kod umjerenog i teškog oblika bolesti često je potrebno uvođenje dodatnih oblika liječenja poput farmakoterapije. Kako su hiperosmolarnost suznog filma i posljedična upala ključni događaji kod bolesti suhog oka, farmakoterapija je uglavnom usmjerena na upalnu komponentu bolesti (20). Lijekovi odobreni za liječenje bolesti suhog oka prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Lijekovi odobreni za liječenje bolesti suhog oka.

Skupina	Naziv	Djelatna tvar	Tehnološki oblik	Nositelj odobrenja
Imunomodulatori	Restasis®	ciklosporin A (0,05 %)	nanoemulzija	Allergan
	Lacrimmune®	ciklosporin A (0,05 %)	nanoemulzija	Bausch & Lomb
	Ikervis®	ciklosporin A (0,1 %)	nanoemulzija	Santen
	Cequa®	ciklosporin A (0,09 %)	micelarna otopina	Sun Pharmaceutical Industries
Antagonisti integrina	Xiidra®	lifitegrast (5 %)	otopina	Shire
Sekretogoi mucina i/ili vodene komponente suza	Diquas®	dikvafozol (3 %)	otopina	Santen
	Mucosta®	rebamipid (2 %)	suspencija	Otsuka Pharmaceutical

U SAD-u je 2003. godine Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila prvi lijek za liječenje bolesti suhog oka – kapi za oko Restasis® (Allergan) koje sadrže 0,05 % ciklosporina A. 2015. godine na europskom je tržištu također odobren lijek za liječenje bolesti suhog oka – kapi za oko Ikervis® (Santen) s 0,1 % ciklosporina A. Ciklosporin A je metabolit izoliran iz gljivica *Tolypocladium inflatum* i *Beauveria nevus*, ciklički peptid sastavljen od 11 aminokiselina s imunomodulatornim i protuupalnim djelovanjem. Ciklosporin A ima specifično djelovanje usmjereno na T-limfocite, sprječavajući njihovu aktivaciju i lučenje proupalnih citokina te nastanak upale (21). Također, ciklosporin A povećava izlučivanje suza, smanjuje hiperosmolarnost suznog filma, sprječava apoptozu stanica te povećava broj i gustoću vrčastih stanica spojnice oka. Zbog specifičnog djelovanja na T-limfocite, ciklosporin A je prikladan za dugotrajnu upotrebu, koja je nužna zbog kronične naravi bolesti, bez opasnosti od izazivanja ozbiljnijih nuspojava, stoga je ciklosporin A lijek izbora za liječenje umjerenog do teškog oblika bolesti suhog oka (15, 21). Ipak, nastup djelovanja kod topikalne oftalmičke primjene ciklosporina A značajno je odgođen, čak i do 3 mjeseca od početka liječenja, što može negativno utjecati na adherenciju pacijenata, stoga se u nekim slučajevima preporučuje početna kombinirana terapija ciklosporinom A i topikalnim glukokortikoidima, s ciljem ubrzanja nastupa protuupalnog učinka i olakšanja simptoma (15, 22).

Takrolimus je još jedan imunomodulatorni lijek čije je djelovanje usmjereno na T-limfocite, no posjeduje jače immunosupresivno djelovanje od ciklosporina A (23). Dosadašnja ispitivanja ukazuju na potencijal primjene takrolimusa u slučajevima intolerancije ili slabih ishoda liječenja ciklosporinom A (15).

2016. godine FDA je odobrila novi lijek za liječenje bolesti suhog oka – kapi za oko u obliku otopine koja sadrži 5 % lifitegrasta (Xiidra[®], Shire). Lifitegrast je antagonist integrina koji djeluje protuupalno sprječavajući vezanje T-limfocita na endotel kapilara i njihovu migraciju u okolno tkivo (24, 25).

Topikalni glukokortikoidi također se uspješno koriste za liječenje bolesti suhog oka, samostalno ili u kombinaciji s ciklosporinom A. Protuupalno djelovanje glukokortikoida omogućuje brzo i uspješno uklanjanje znakova i simptoma bolesti. Ipak, njihova je primjena vremenski ograničena na približno 2 tjedna zbog potencijalno ozbiljnih nuspojava, poput povišenog očnog tlaka, katarakte te oportunističkih infekcija, koje se mogu javiti nakon dulje upotrebe (15, 20). Među glukokortikoidima posebno se ističe loteprednoletonat, koji se zbog svoje posebne strukture hidrolitički razgrađuje ne neaktivne metabolite nedugo nakon vezanja na receptore i njihove aktivacije, stoga ima manji potencijal za razvoj nuspojava te postoji mogućnost njegove produljene upotrebe (26, 27).

Još jedna skupina lijekova s potencijalom za liječenje bolesti suhog oka su topikalni nesteroidni antireumatici (NSAR) koji za razliku od glukokortikoida nemaju immunosupresivni učinak te ne izazivaju nuspojave karakteristične za glukokortikoide (15, 20). Također, jedna je studija dokazala osmoprotektivni učinak diklofenaka na modelu bolesti suhog oka na štakorima (28). Ipak, zabilježen je slučaj obostranog stanjenja rožnice nakon dvotjedne primjene kapi za oko s bromfenakom kod dvadesetogodišnje pacijentice čija je bolest suhog oka bila posljedica Stevens Johnsonovog sindroma, stoga je potreban oprez pri propisivanju topikalnih NSAR kod pacijenata s težim oblicima bolesti suhog oka (29).

Antibiotici tetraciklini i azitromicin također se koriste u liječenju bolesti suhog oka jer osim antibakterijskog posjeduju i protuupalno djelovanje. Mehanizam protuupalnog djelovanja tetraciklina je inhibicija enzima kolagenaze, fosfolipaze A2 te metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa, kao i inhibicija izlučivanja različitih medijatora upale iz epitelnih stanica rožnice. Tetraciklini se često propisuju kod rozaceje, disfunkcije Meibomovih žlijezda i blefaritisa povezanih s bolešću suhog oka. Tetraciklini se uzimaju peroralno, iako još uvijek nije utvrđen

optimalan režim doziranja. Primjena azitromicina može biti vrlo učinkovita kod rozaceje s pridruženom disfunkcijom Meibomovih žlijezda te se smatra da azitromicin pospješuje funkciju epitelnih stanica Meibomovih žlijezda i da pomaže u kontroli bakterijske flore i upale vjeđa. Za azitromicin, osim peroralne, postoji i mogućnost topikalne oftalmičke primjene, iako ni za jedan put primjene još uvijek ne postoji optimalan režim doziranja (15).

Topikalni sekretogoci još su jedna skupina lijekova za liječenje bolesti suhog oka, čiji se učinak temelji na poticanju izlučivanja mucina i/ili vodene komponente suza. Dikvafosol je lijek koji potiče epitelne i vrčaste stanice spojnice oka na izlučivanje mucina i vode, a odobren je u Japanu i Južnoj Koreji kao otopina (3 %, Diquas[®], Santen). Rebamipid je mucinski sekretogoc koji potiče epitelne stanice rožnice na lučenje transmembranskih mucina te je odobren u Japanu kao suspenzija (2 %, Mucosta[®], Otsuka Pharmaceutical) (15).

Oralna primjena parasimpatomimetika pilokarpina i cevimelina odobrena je od strane FDA za liječenje suhoće usta koja je posljedica Sjögrenovog sindroma jer potiču izlučivanje sline, no postoje kliničke studije koje dokazuju njihovu učinkovitost u liječenju bolesti suhog oka kod pacijenata sa Sjögrenovim sindromom jer, osim sline, potiču i izlučivanje suza (30).

Oligonukleotid mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (engl. *small interfering ribonucleic acid*, siRNA) inovacija je u liječenju raznih bolesti pa tako i u liječenju bolesti suhog oka. Topikalna primjena siRNA SYL1001 s 19 parova baza omogućuje selektivnu razgradnju glasničke RNA i inhibiciju sinteze vaniloidnih receptora tipa TRPV1 (engl. *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*). TRPV1 receptor kod bolesti suhog oka sudjeluje u prijenosu bolnih podražaja, a pokazalo se da također sudjeluje u modulaciji upalnih procesa. Klinička ispitivanja (faza I i II) dokazala su sigurnost topikalne oftalmičke primjene SYL1001 i učinkovitost u smanjenju boli i hiperemije spojnice kod bolesti suhog oka (31).

1.2.6. Konvencionalni topikalni farmaceutski oblici za liječenje bolesti suhog oka i njihovi nedostaci

Kao i druge bolesti koje zahvaćaju prednji segment oka, bolest suhog oka najčešće se liječi topikalnom primjenom kapi za oko. Površina oka lako je dostupna, a primjena kapi za oko jednostavna i neinvazivna. U liječenju suhog oka glavni je cilj zadržavanje pripravka u suznom filmu i apsorpcija djelatne tvari u površinske slojeve oka (epitel rožnice i spojnice) zahvaćene upalom (32). Ipak, zbog posebnosti anatomije i fiziologije oka taj cilj nije lako postići. Volumen suza iznosi približno 7 μ L, pri čemu se veći dio suza nalazi u donjoj konjunktivalnoj vrećici,

dok približno 1 μL suzne tekućine prekriva površinu oka. Oko može zadržati vrlo ograničeni volumen tekućine (približno 30 μL) bez prelijevanja preko rubova vjeđa, a kako prosječni volumen kapi za oko iznosi 40 μL , veliki se dio primijenjene doze gubi neposredno nakon primjene. Osim toga, suzenje, treptanje i nazolakrimalna drenaža omogućuju brzu izmjenu suza od oko 1 μL po minuti, čime se s površine oka učinkovito uklanjaju strane čestice, ali i djelatne tvari (33, 34). Ti protektivni mehanizmi oka uzrok su vrlo ograničenom vremenu zadržavanja konvencionalnih kapi za oko te činjenici da se oko 80 % primijenjene djelatne tvari ukloni unutar 2 minute nakon primjene, zbog čega nastaje potreba za učestalim doziranjem, što smanjuje adherenciju pacijenata (35). Osim toga, uklapanje djelatnih tvari u konvencionalne kapi za oko u obliku vodene otopine vrlo često predstavlja problem jer je većina djelatnih tvari lipofilna i slabo topljiva u vodi. Od lipofilnih se djelatnih tvari, poput glukokortikoida, često pripremaju vodene suspenzije, čiji je veliki nedostatak fizička nestabilnost. Također, radi ujednačenosti doziranja kapi za oko suspenzije potrebno je protresti neposredno prije primjene, što se, nažalost, u praksi često ne provodi. Povrh svega, zbog činjenice da je samo otopljena frakcija djelatne tvari na raspolaganju za apsorpciju i učinak, uklapanje veće količine djelatne tvari u suspenziju samo umjereno povećava apsorpciju u odnosu na zasićenu vodenu otopinu (33). Masti za oko još su jedan često propisivani farmaceutski oblik u oftalmologiji. To su pripravci polučvrste konzistencije kod kojih je djelatna tvar najčešće suspendirana u lipofilnoj podlozi. Iako zbog značajno veće viskoznosti u odnosu na kapi za oko masti omogućuju dulje zadržavanje pripravka na oku, varijabilnost doziranja je veća, a kako zamućuju vid najčešće se primjenjuju samo prije spavanja (21, 36). Kako bi se nadišli nedostaci postojećih farmaceutskih oblika nužan je razvoj inovativnih formulacija koje bi omogućile dulje zadržavanje djelatne tvari na površini oka i bolju apsorpciju u epitelne stanice površine oka zahvaćene upalom te smanjile potrebu za učestalim doziranjem, što bi povećalo adherenciju pacijenata i ishode liječenja bolesti suhog oka.

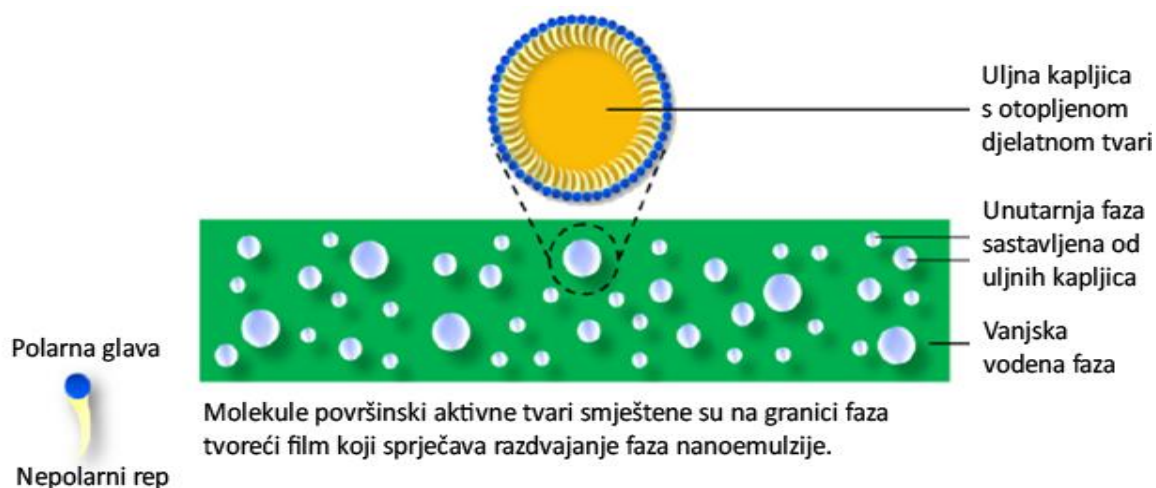
1.2.7. Inovativni terapijski nanosustavi za liječenje bolesti suhog oka

Nanotehnologija nudi brojne mogućnosti za unaprjeđenje liječenja bolesti suhog oka. Topikalni nanosustavi omogućuju bolje uklapanje djelatnih tvari slabo topljivih u vodi te istovremenu zaštitu djelatnih tvari od enzimske razgradnje u suznom filmu. Također, nanosustavi omogućuju produljeno zadržavanje i bolju interakciju djelatne tvari s površinom oka te postizanje veće koncentracije djelatne tvari na ciljnom mjestu (37). Liječenje bolesti suhog oka vjerojatno je najbolji primjer iskorištavanja prednosti nanotehnologije. Komercijalno dostupni nanosustavi za liječenje bolesti suhog oka su nanoemulzije s ciklosporinom A (Restasis®,

Allergan; Lacrinmune[®], Bausch & Lomb; Ikervis[®], Santen), micelarna otopina s ciklosporinom A (Cequa[®], Sun Pharmaceutical Industries) te sprejevi za oko s liposomima bez uklopljene djelatne tvari (Tears Again[®], Optima Pharmazeutische; Dry Eye Mist[®], Boots; Tear Mist[®], Tesco).

1.3. NANOEMULZIJE ZA LIJEČENJE BOLESTI SUHOG OKA

Nanoemulzije su disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju stabilizirane površinski aktivnim tvarima, s kapljicama unutarnje faze nanometarskih veličina (50-700 nm) (38). Nanoemulzije mogu biti tipa ulje u vodi (U/V), voda u ulju (V/U) ili mješovitog U/V/U ili V/U/V tipa. U oftalmičkoj primjeni koristi se U/V tip nanoemulzija zbog mogućnosti miješanja sa suznim filmom nakon primjene, a veličina kapljica unutarnje uljne faze najčešće iznosi 200-300 nm (38–40). Unutarnja struktura nanoemulzija U/V tipa shematski je prikazana slikom 3. Nanoemulzije za oftalmičku primjenu služe kao tehnološka platforma za uklapanjem lipofilnih, slabo topljivih djelatnih tvari, što omogućuje njihovu jednostavnu primjenu u obliku konvencionalnih kapi za oko. Također, biorazgradljivost, mala veličina kapljica, mala viskoznost, mogućnost sterilizacije nakon pripreve, mogućnost uklapanja djelatnih tvari u unutrašnjosti ili na samom rubu kapljica uljne faze te poboljšana bioraspoloživost djelatnih tvari u očnoj vodici čini nanoemulzije izuzetno prikladnim terapijskim nanosustavom za oftalmičku primjenu (17, 38). Mali udio površinski aktivnih tvari omogućuje dobru oftalmičku podnošljivost nanoemulzija, a kako se djelatna tvar nalazi otopljena unutar uljnih kapljica, rizik taloženja djelatne tvari nakon primjene sveden je na najmanju moguću mjeru. Mala veličina kapljica osigurava veliku ukupnu površinu za oslobađanje djelatne tvari koja time postaje dostupna za apsorpciju (41). Ciklosporin A u obliku kapi za oko prvi je odobreni lijek za liječenje bolesti suhog oka te je zbog svoje djelotvornosti, sigurnosti i mogućnosti dugotrajne primjene lijek izbora za liječenje umjerenih do teških oblika bolesti (21). Unatoč tome, slaba topljivost u vodi ($< 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ pri fiziološkoj temperaturi) onemogućuje njegovo uklapanje u konvencionalne kapi za oko u obliku vodene otopine (42). Pokušaji poboljšanja topljivosti ciklosporina A korištenjem površinski aktivnih tvari u velikim koncentracijama, pripravom uljnih otopina te masti za oko najčešće su završavali prekidom terapije zbog loše podnošljivosti, lokalne iritacije i/ili toksičnosti (21). Restasis[®] je prvi lijek odobren za liječenje bolesti suhog oka. Sadrži 0,05 % ciklosporina A uklopljenog u nanoemulziju s ricinusovim uljem. Nakon kapi za oko Restasis[®], na tržištu se pojavljuju i druge kapi za oko s ciklosporinom A u obliku nanoemulzije (Lacrinmune[®], Bausch & Lomb; Ikervis[®], Santen) (41).

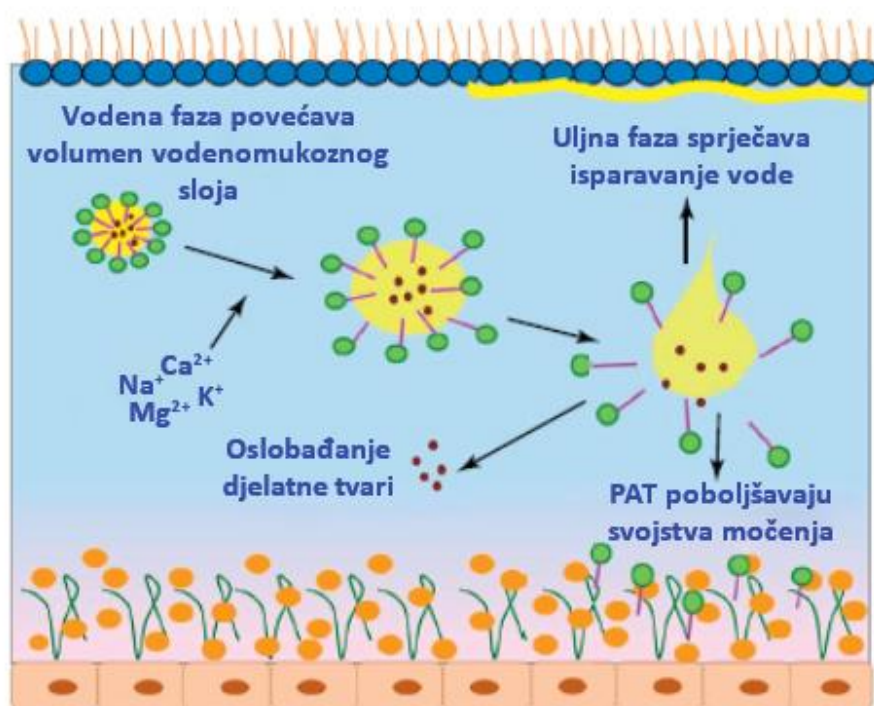


Slika 3. Shematski prikaz unutarnje strukture nanoemulzije U/V tipa (uz dozvolu *Elsevier*-a preuzeto i prilagođeno iz reference (40)).

1.3.1. Sudbina nanoemulzija nakon topikalne oftalmičke primjene

Iako se isprva čini da su nanoemulzije jednostavni pripravci kod kojih je djelatna tvar otopljena unutar kapljica uljne faze, stabiliziranih površinski aktivnim tvarima, nanoemulzije su zapravo vrlo složeni sustavi. Molekule površinski aktivnih tvari mogu se nalaziti na površini uljnih kapljica ili tvoriti micelle u vanjskoj vodenoj fazi. Uljne kapljice mogu biti prisutne u različitim veličinama, a otopljena djelatna tvar, osim unutar uljnih kapljica, može se nalaziti i u vodenoj fazi, micelama te na granici između uljne i vodene faze. Raspodjela djelatne tvari unutar same nanoemulzije može u konačnici utjecati na brzinu i opseg apsorpcije te raspodjelu djelatne tvari u tkiva oka. U nanoemulziji Restasis[®] za stabilizaciju su korištene dvije pomoćne tvari: površinski aktivna tvar polisorbitat 80 i karbomer kopolimer tipa A koji je osjetljiv na prisutnost soli (43). Prema dosadašnjem shvaćanju, nakon primjene nanoemulzije Restasis[®] na površinu oka formulacija se razrjeđuje suzama, a njezin su raspad i interakcija sa suznim filmom prikazani slikom 4. Zbog sadržaja soli u suznom filmu karbomer kopolimer tipa A gubi svojstvo povećanja viskoznosti te napušta površinu uljnih kapljica i micelle, čime započinje raspad nanoemulzije, a daljnje razrjeđivanje suzama dodatno ga potiče i ubrzava. Raspadom nanoemulzije djelatna se tvar oslobađa u suznom filmu, čime postaje dostupna za apsorpciju i učinak. Oslobodena se uljna faza stapa s lipidnim slojem suznog filma, pri čemu neoslobodena frakcija djelatne tvari prisutna u uljnoj fazi služi kao depo. Oslobodene molekule površinski aktivnih tvari ulaze u interakciju s lipidnim slojem suznog filma i mucinima, čime se poboljšava močenje površine oka (43, 44). Predloženom mehanizmu raspada nanoemulzije nakon primjene

ide u prilog istraživanje provedeno na 10 dobrovoljaca s dijagnozom bolesti suhog oka i 5 zdravih dobrovoljaca, koje je pokazalo da je čak 4 sata nakon topikalne oftalmičke primjene jedne kapi nanoemulzije s ricinusovim uljem (bez uklopljene djelatne tvari) moguće detektirati ricinusovo ulje u suzama ispitanika. Također, kod oboljelih ispitanika primijećeno je značajno poboljšanje simptoma (45). Iz mehanizma raspada nanoemulzija nakon topikalne oftalmičke primjene moguće je zaključiti da su to funkcionalni nanosustavi koji, osim za dostavu djelatne tvari, služe i za nadoknadu vodene, mucinske i lipidne komponente suznog filma povećavajući mu pritom volumen i stabilnost te da se stoga mogu uspješno koristiti za uklanjanje simptoma bolesti suhog oka, čak i kada ne sadrže djelatnu tvar (17, 18, 44).



Slika 4. Raspad i interakcija nanoemulzije sa suznim filmom nakon primjene; PAT – površinski aktivne tvari (uz dozvolu Elsevier-a preuzeto i prilagođeno iz reference (44)).

Na interakciju nanoemulzija s površinom oka značajan utjecaj ima naboj na površini kapljica. S obzirom na naboj, nanoemulzije mogu biti anionske ili kationske. Vrstu naboja najčešće određuje izbor površinski aktivnih tvari pa su tako nanoemulzije pripravljene korištenjem negativno nabijenih površinski aktivnih tvari anionske, dok su nanoemulzije pripravljene korištenjem pozitivno nabijenih površinski aktivnih tvari kationske (38). Nanoemulzije pripravljene korištenjem isključivo neionskih površinski aktivnih tvari nisu neutralne, već posjeduju blago negativan naboj na površini kapljica koji najvjerojatnije potječe od slobodnih

masnih kiselina iz uljne faze i njihove orijentacije prema površini kapljica ili od hidroksidnih iona iz vanjske vodene faze adsorbiranih na površini kapljica (46, 47). Epitelne stanice na površini oka prekrivene su transmembranskim mucinima koji su pri fiziološkom pH negativno nabijeni zbog ostataka sijalinske i sulfonske kiseline u strukturi (48). Smatra se da je elektrostatska interakcija pozitivno nabijenih uljnih kapljica i negativno nabijenih mucina temelj mukoadhezivnog djelovanja i produljenog zadržavanja kationskih nanoemulzija na površini oka (17, 44). Danas se sve komercijalno dostupne kationske nanoemulzije za oftalmičku primjenu (za liječenje bolesti suhog oka) temelje na Novasorb® tehnologiji, kod koje se kao nositelj pozitivnog naboja koristi kvarterni amonijev spoj cetalkonijev klorid (CAK) – vrlo lipofilna komponenta benzalkonijevog klorida (BAK). Kako je CAK izrazito lipofilna molekula ($\log P = 9,5$) površinski aktivnih svojstava, u formulaciji je gotovo u potpunosti vezan za površinu uljnih kapljica čineći ih pozitivno nabijenima, stoga je koncentracija slobodnih molekula CAK-a u vanjskoj vodenoj fazi nanoemulzije izrazito mala (17). Samim time onemogućena je interakcija CAK-a sa staničnom membranom i posljedično toksično djelovanje na epitel rožnice i spojnice oka. Antimikrobni učinak CAK-a također je onemogućen, stoga su formulacije temeljene na Novasorb® tehnologiji nekonzervirane i pakirane u jednodozne spremnike (17, 49). Ikervis® (Santen) su kapi za oko u obliku nanoemulzije s ciklosporinom A pripravljene Novasorb® tehnologijom. Za razliku od anionske nanoemulzije Restasis® koja sadrži 0,05 % ciklosporina A i primjenjuje se dvaput dnevno, Ikervis® sadrži dvostruko veći udio ciklosporina A (0,1 %) i primjenjuje se samo jedanput dnevno, što potvrđuje pretpostavljeni mehanizam mukoadhezivnog djelovanja kationskih nanoemulzija. Intrinzičnu funkcionalnost i djelotvornost kationskih nanoemulzija potvrđuje plasiranje kapi za oko u obliku nanoemulzije Cationorm® (Santen) bez uklopljene djelatne tvari na globalno tržište, koje su također pripravljene Novasorb® tehnologijom. Cationorm® kapi za oko dostupne su kao medicinski proizvod za uklanjanje simptoma blagog do umjerenog oblika bolesti suhog oka nakon što su u kliničkim ispitivanjima pokazale veći uspjeh u otklanjanju simptoma i kliničkih znakova bolesti u odnosu na komercijalno dostupne kapi za oko (umjetne suze) Refresh Tears® (Allergan) i Emustil® (SIFI), uz jednaku sigurnost primjene (17).

1.3.2. Pomoćne tvari u pripravi nanoemulzija za oftalmičku primjenu

Prije same pripreve nanoemulzija potrebno je posvetiti posebnu pažnju odabiru vrste i udjela pomoćnih tvari, odnosno formulacijskim parametrima. Pomoćne tvari ne smiju iritirati oko nakon primjene, ali istovremeno moraju osigurati otapanje djelatne tvari i stabilnost formulacije te omogućiti pripravu nanoemulzije željenih svojstava.

1.3.2.1. Uljna faza

Udio uljne faze ne bi trebao biti veći od 5 % (*m/m*) kako bi se viskoznost formulacije održala unutar raspona prikladnog za kapi za oko (2-3 mPas) (38). Topljivost djelatne tvari u uljnoj fazi ključna je za odabir vrste i udjela uljne faze. Kako udio uljne faze ne bi prešao zadano ograničenje, topljivost djelatne tvari u odabranoj uljnoj fazi mora biti dovoljna, s obzirom na ciljni udio djelatne tvari u formulaciji. Korištenjem visokopročišćenih ulja prikladnih za oftalmičku primjenu moguće je postići izuzetnu podnošljivost nanoemulzija (44). Kao uljna faza u komercijalno dostupnim kapima za oko koristi se ricinusovo ulje, tekući parafin, trigliceridi srednje duljine lanaca, sojino ulje i fosfolipidi (17, 18, 38). Od ostalih se ulja s potencijalom za oftalmičku primjenu u literaturi spominju i sezamovo ulje, ulje kukuruza, maslinovo ulje i kokosovo ulje (15, 38, 50).

1.3.2.2. Površinski aktivne tvari

Neionske površinski aktivne tvari, poput polisorbata, poloksamera, kremofora, tiloksapola i D- α -tokoferilpolietilenglikol 1000 sukcinata (vitamina E-TPGS), prikladne su za oftalmičku primjenu zbog malog iritacijskog potencijala (17, 38). Njihov konačni udio kompromis je između stabilnosti i toksičnosti formulacije. Lecitin je također površinski aktivna tvar prikladna za oftalmičku primjenu. Lecitin je zapravo smjesa fosfolipida, a kao sirovina u farmaceutskoj industriji najčešće se koristi lecitin izoliran iz sjemena soje ili iz žumanjka jajeta (51). Lecitin sadrži i fosfolipide koji su fiziološki prisutni u suznom filmu (fosfatidilkolin, lizofosfatidilkolin i fosfatidiletanolamin), stoga je prikladnost lecitina kao sastavne komponente nanoemulzija za oftalmičku primjenu time još veća (5).

1.3.2.3. Nositelji pozitivnog naboja

U pripravi kationskih nanoemulzija za oftalmičku primjenu potrebno je koristiti nositelje pozitivnog naboja, poput kationskih površinski aktivnih tvari, kationskih lipida ili polimera (17, 38). Iako je danas CAK jedini nositelj pozitivnog naboja koji se nalazi u sastavu komercijalno dostupnih nanoemulzija za oftalmičku primjenu, u literaturi se, također, spominju i drugi nositelji pozitivnog naboja, poput stearilamina, oleilamina, N-1-(2,3-dioleoiloksi)propil)-N,N,N trimetilamonijevog klorida (DOTAP) i kitozana (17, 38). Stearilamin, oleilamin i DOTAP su kationski lipidi, među kojima je stearilamin najčešće korišten u pripravi kationskih nanoemulzija (52–56). Stearilamin je primarni alkilamin čija je amino skupina pozitivno nabijena u širokom pH rasponu (pKa 10,6). Zbog netopljivosti u vodi, kod pripreme

nanoemulzija stearylamin je neposredno prije miješanja faza potrebno otopiti u uljnoj fazi. Zahvaljujući površinski aktivnim svojstvima stearylamin se smješta na površinu uljnih kapljica čineći ih pozitivno nabijenima (57). Ispitivanjem na animalnom modelu oka kunića dokazana je biokompatibilnost i sigurnost primjene kationskih nanoemulzija sa stearylaminom koje su kunićima primjenjivane čak 8 puta dnevno tijekom 5 dana (55). Oleilamin je također primarni alkilamin strukturno sličan stearylaminu, no zbog prisutnosti nezasićene veze u alifatskom lancu manje je stabilan od stearylamina (17). DOTAP je kationski lipid koji u svojoj strukturi sadrži kvarternu amonijevu skupinu zbog koje posjeduje pozitivan naboj. DOTAP je biorazgradljiv i dobro se podnosi nakon primjene. Nedostatak DOTAP-a je kemijska nestabilnost zbog čega ga je potrebno čuvati pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, što ograničava njegovu primjenu u industriji (17). Prirodni polimer kitozan u istraživanjima se često koristi u pripravi nanosustava za oftalmičku primjenu (58). Kitozan je polisaharid dobiven deacetilacijom hitina, a sastoji se od monosaharida glukozamina i N-acetilglukozamina. Topljiv je u kiselom mediju jer pri nižim vrijednostima pH dolazi do protonacije amino skupina glukozamina, čija je pKa vrijednost 6,2-7 (59). Zahvaljujući pozitivnom naboju kitozan posjeduje mukoadhezivna svojstva, iako vodikove veze i hidrofobne interakcije također sudjeluju u procesu mukoadhezije. Osim biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, kitozan djeluje i kao promotor apsorpcije otvaranjem čvrstih spojeva između stanica, a njegova antimikrobna svojstva od velike su važnosti za topikalnu oftalmičku primjenu, pogotovo kada je riječ o bolesti suhog oka kod koje su sekundarne bakterijske infekcije učestali problem (58). Također, kitozan može povećati stabilnost nanoemulzije jer, osim što sprječava koalescenciju kapljica mehanizmom elektrostatskog odbijanja, na površini kapljica stvara nepropustan film koji sprječava rast kapljica mehanizmom Ostwaldovog zrenja (60). Uklapanje kitozana u nanoemulziju najčešće se provodi tako da se najprije pripravi anionska nanoemulzija (primarna nanoemulzija), a zatim slijedi dodatak kitozana (u obliku vodene otopine) u gotovu formulaciju. Zahvaljujući pozitivnom naboju kitozan se smješta na površini negativno nabijenih uljnih kapljica koje tada poprimaju pozitivan naboj te nastaje sekundarna kationska nanoemulzija (61).

1.3.2.4. Konzervansi

Kao konzervansi u kapima za oko najčešće se koristi BAK. BAK je smjesa kvarternih amonijevih spojeva koji elektrostatski posredovanim interakcijama narušavaju integritet negativno nabijene membrane mikroorganizama, čime uzrokuju izlazak staničnog sadržaja i posljedičnu smrt mikroorganizama. Učinkovitost BAK-a kao konzervansa je neupitna, no problem je u njegovom neselektivnom djelovanju jer, osim na membrane mikroorganizama, na

jednak način djeluje i na membrane stanica sisavaca pa tako i na membrane epitelnih stanica rožnice i spojnice te vrčastih stanica spojnice oka. Štetni učinci BAK-a najviše dolaze do izražaja uslijed njegove dugotrajne, kronične primjene, kao što je liječenje glaukoma za koje se najčešće koriste kapi za oko konzervirane dodatkom BAK-a. Velik broj pacijenata s glaukomom žali se na simptome bolesti suhog oka, a postoje i brojni dokazi o bolesti suhog oka koja se javlja kao posljedica liječenja glaukoma kapima za oko s BAK-om (62, 63). Preporuka je, stoga, da se za liječenje bolesti suhog oka izbjegavaju topikalni oftalmički pripravci koji sadrže BAK. Zbog kronične naravi bolesti preporučuje se izbjegavanje i ostalih konzervansa jer postoje dokazi da čak i oni konzervansi koji se nakon primjene raspadaju na prirodne komponente suza (npr. Purite[®]) mogu izazvati određene štetne učinke na površini oka (15).

1.3.2.5. Tvari za povećanje viskoznosti

Tvari za povećanje viskoznosti dodaju se u nanoemulziju radi produljenja kontakta s površinom oka, a imaju i druge pozitivne učinke, poput povećanja debljine suznog filma i zaštite površine oka, koji vode k ublažavanju simptoma bolesti suhog oka (15). Ispitivanja na kunićima i miševima ukazuju na to da umjetne suze koje sadrže hijaluronsku kiselinu (64) ili hijaluronsku kiselinu u kombinaciji s karboksimetilcelulozom (65) mogu povećati gustoću vrčastih stanica spojnice oka. Kapi za oko s ciklosporinom A u obliku nanoemulzije Restasis[®] (Allergan) sadrže karbomer kopolimer tipa A koji, osim što povećava viskoznost formulacije, dodatno stabilizira formulaciju i produljuje joj rok valjanosti (43). Lacrinmune[®] (Bausch & Lomb) kapi za oko s ciklosporinom A u obliku nanoemulzije odobrene u Argentini kao tvar za povećanje viskoznosti sadrže hijaluronsku kiselinu (41).

1.3.2.6. Ostale pomoćne tvari

Od ostalih pomoćnih tvari u pripravi nanoemulzija koriste se tvari za izotonizaciju i prilagodbu pH vrijednosti (NaOH ili HCl), puferi i, naravno, pročišćena voda koja čini najveći dio formulacije (17, 38). U pripravi kationskih nanoemulzija potrebno je koristiti tvari za izotonizaciju bez naboja, poput glicerola, sorbitola, manitola, propilenglikola ili dekstroze, kako ne bi prekrile pozitivan naboj uljnih kapljica. Pufere nije nužno koristiti jer se pH vrijednost suza nakon primjene nepuferiranih kapi za oko, čiji se pH razlikuje od pH suza, vrlo brzo vraća na fiziološke vrijednosti zahvaljujući puferskom kapacitetu suza (17, 66).

1.3.3. Metode priprave nanoemulzija

Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi te je za njihovo nastajanje potrebno uložiti energiju. Koji tip nanoemulzije će nastati najviše ovisi o udjelu pojedine faze jer ona faza koja prevladava najčešće postaje vanjska faza, što je u slučaju U/V tipa nanoemulzija vodena faza. Površinski aktivne tvari također imaju bitnu ulogu u nastajanju nanoemulzija. Ako je korištena površinski aktivna tvar ili, u slučaju kada se koristi više površinski aktivnih tvari, najzastupljenija površinski aktivna tvar topljiva u vodi, preferirano nastaje U/V tip nanoemulzije. U slučaju kada se koriste površinski aktivne tvari topljive u uljima preferirano nastaje V/U tip nanoemulzije. Polarni dio površinski aktivne tvari obično stvara jaču barijeru spajanja kapljica i raspadu nanoemulzije od nepolarnog dijela, tako da je kod U/V tipa nanoemulzije moguće uklopiti veći udio unutarnje faze nego kod V/U tipa (40). Ovisno o veličini kapljica izgled nanoemulzija može varirati od mliječno bijelog do gotovo potpuno transparentnog. Što su kapljice unutarnje faze manje, nanoemulzija će biti transparentnija (67, 68). Količina smicanja primijenjena na sustav izravno je povezana s konačnom veličinom kapljica nanoemulzije. Smicanje uzrokuje deformaciju i istežanje uljnih kapljica koje se u konačnici dijele na manje kapljice, čime se postiže smanjenje veličine kapljica. Osim smicanja, ključnu ulogu u nastajanju nanoemulzija imaju i površinski aktivne tvari koje smanjenjem površinske napetosti na granici faza smanjuju količinu smicanja potrebnu za smanjenje veličine kapljica do nanometarskih dimenzija (40). Također, površinski aktivne tvari nužne su za stabilizaciju novonastalih kapljica i sprječavanje njihovog ponovnog spajanja u veće kapljice. Smanjenjem veličine kapljica povećava se ukupna površina, a time i ukupna energija sustava. Jedan od načina za smanjenje ukupne energije sustava je ponovno spajanje manjih kapljica u veće. Na putu jedne kapljice prema drugoj, s ciljem spajanja, kapljice na svojoj površini adsorbiraju molekule površinski aktivnih tvari koje se nalaze u vanjskoj fazi, čime se smanjuje površinska napetost na granici faza i ukupna energija sustava. Adsorpcijom molekula površinski aktivnih tvari na površini novonastalih kapljica smanjuje se koncentracija površinski aktivnih tvari u neposrednoj blizini kapljica. Time nastaje koncentracijski gradijent koji povlači molekule površinski aktivnih tvari prema području manje koncentracije. Dotok molekula površinski aktivnih tvari povlači za sobom i vodu prema površini uljnih kapljica, čime se sprječava spajanje novonastalih kapljica. Kako bi kapljice ostale stabilne, molekule površinski aktivnih tvari moraju se u dovoljnoj količini nalaziti u vanjskoj fazi i biti na raspolaganju za oblaganje površine kapljica. Kada su molekule površinski aktivnih tvari prisutne u vanjskoj fazi u suvišku, brzina spajanja kapljica postaje zanemariva pa na konačnu veličinu kapljica utječe

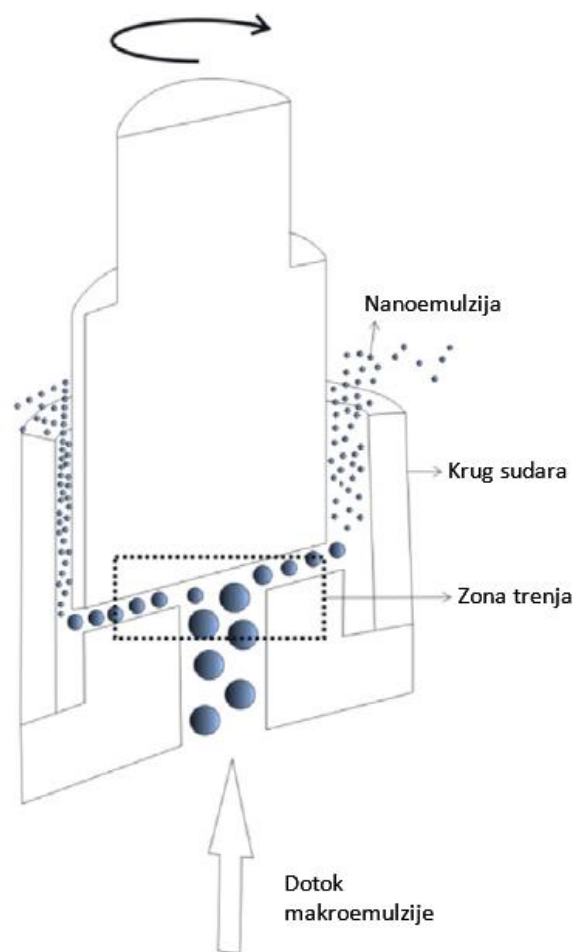
isključivo brzina dijeljenja kapljica. Što su kapljice manje, veća je njihova ukupna površina pa je potrebno više površinski aktivnih tvari za stabilizaciju novonastale nanoemulzije (40). Kao pomoćne tvari u pripravi nanoemulzija moguće je koristiti i alkohole srednje duljine lanaca koji olakšavaju emulgiranje ugradnjom na površinu uljnih kapljica između molekula površinski aktivnih tvari, čime se povećava fluidnost sloja na granici faza (69). Na konačnu veličinu kapljica utječe i viskoznost uljne i vodene faze. Korištenjem jako viskoznih ulja smanjenje veličine kapljica je otežano te u konačnici nastaje emulzija s kapljicama većih dimenzija. U tom je slučaju povećanjem viskoznosti vanjske faze moguće postići dodatno smanjenje veličine kapljica (40). Metode pripreme nanoemulzija prema izvoru energije dijele se na dvije glavne skupine: visokoenergetske i niskoenergetske metode (70).

1.3.3.1. Visokoenergetske metode

Za pripravu nanoemulzija visokoenergetskim metodama potrebni su uređaji koji stvaraju mehaničku energiju u količini koja je dostatna za smanjenje veličine kapljica do nanometarskih dimenzija. Ti se uređaji dijele na visokotlačne homogenizatore, mikrofluidizatore i ultrasonikatore, a razlikuju se u temeljnom principu rada. Prije same obrade formulacije pomoću navedenih uređaja potrebno je pripremiti grubu emulziju miješanjem uljne i vodene faze korištenjem miješalice pri velikim brzinama okretaja. Najveća prednost visokoenergetskih pred niskoenergetskim metodama je veća sloboda izbora vrste i udjela pomoćnih tvari, odnosno formulacijskih parametara te mogućnost mijenjanja i prilagodbe procesnih parametara, poput primijenjenog tlaka i broja propuštanja formulacije kroz uređaj (broja ciklusa), kako bi se u konačnici pripravila nanoemulzija željenih fizičko-kemijskih svojstava. Nedostatak visokoenergetskih metoda je stvaranje otpadne energije u obliku topline, no taj se problem vrlo jednostavno rješava uvođenjem hlađenja tijekom rada uređaja (40, 51).

1.3.3.1.1. Visokotlačna homogenizacija

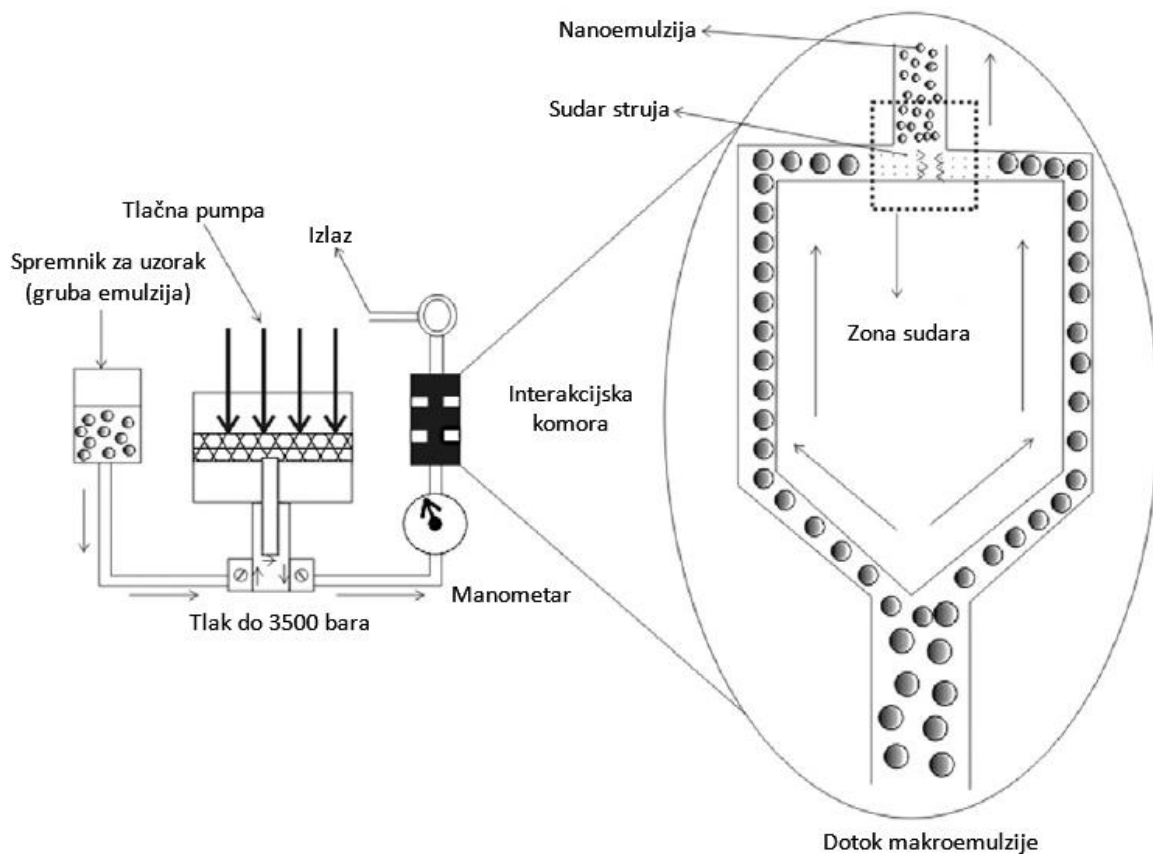
Visokotlačni homogenizatori su uređaji koji rade na principu koloidnog mlina. U tim se uređajima gruba emulzija propušta kroz uzak otvor ($< 10 \mu\text{m}$) između nepomičnog statora i rotora koji se okreće velikom brzinom, pri čemu se stvara veliki gradijent tlaka između mjesta ulaza i izlaza (nano)emulzije. Konačnu veličinu kapljica nanoemulzije određuje širina otvora, od koje kapljice mogu biti manje ili jednake veličine. Za optimalno smanjenje veličine kapljica formulaciju je najčešće potrebno propustiti kroz uređaj nekoliko puta. Visokotlačna homogenizacija prikladna je i za uvećanje procesa pripreme nanoemulzija na industrijsko mjerilo (40, 68). Princip rada visokotlačnog homogenizatora prikazan je slikom 5.



Slika 5. Princip rada visokotlačnog homogenizatora (uz dozvolu *Elsevier*-a preuzeto i prilagođeno iz reference (40)).

1.3.3.1.2. Mikrofluidizacija

Mikrofluidizatori su uređaji koji rade na sličnom principu kao visokotlačni homogenizatori. Kod ovih se uređaja gruba emulzija pod visokim tlakom propušta kroz uske mikrokanaliće interakcijske komore u kojoj, zbog sudara struja formulacije usmjerenih jedne prema drugoj, dolazi do smanjenja veličine kapljica. Kao i visokotlačni homogenizatori, mikrofluidizatori također zahtijevaju višestruko propuštanje formulacije kroz uređaj za postizanje optimalnih rezultata te je također moguće uvećanje procesa pripreve nanoemulzija na industrijsko mjerilo (40). Princip rada mikrofluidizatora prikazan je slikom 6.



Slika 6. Princip rada mikrofluidizatora (uz dozvolu *Elsevier*-a preuzeto i prilagođeno iz reference (40)).

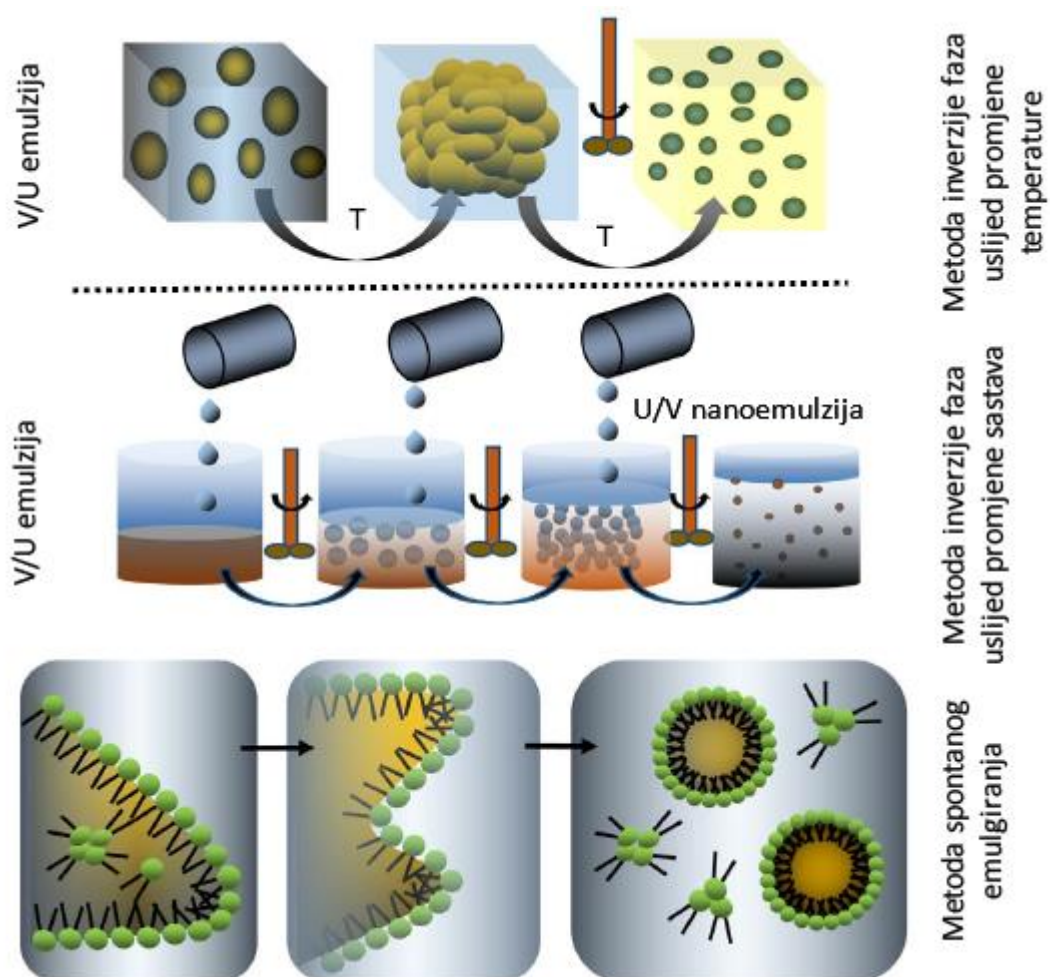
1.3.3.1.3. Ultrasonikacija

Ultrasonikatori su uređaji koji pomoću ultrazvučne sonde smanjuju veličinu kapljica disperzne faze grube emulzije do nanometarskih dimenzija. Prednost tih uređaja je manja potrošnja energije, a nedostatak je mogućnost kontaminacije formulacije pri uranjanju sonde. Iako su se ultrasonikatori donedavno koristili samo u pripravi nanoemulzija u laboratorijskom mjerilu, danas su komercijalno dostupni i uređaji kod kojih se uzorak propušta kroz posebnu kolonu koja proizvodi ultrazvučne valove te je moguće i uvećanje proizvodnje na industrijsko mjerilo (40, 70).

1.3.3.2. Niskoenergetske metode

Korištenjem niskoenergetskih metoda u pripravi nanoemulzija nije potreban vanjski izvor energije jer se iskorištava kemijska energija pohranjena unutar samog sustava. Potrebna je samo jednostavna laboratorijska oprema, poput čaše i magnetske miješalice. Kako se za pripravu nanoemulzija troše znatno manje količine energije, ove su metode ekološki prihvatljivije od

visokoenergetskih metoda te, osim toga, omogućuju nastajanje nanoemulzija manjih prosječnih veličina kapljica. Najveće ograničenje ovih metoda je značajno sužen izbor tvari za priprevu nanoemulzija (ulja i površinski aktivnih tvari). Također, nema puno istraživanja koja se bave uvećanjem procesa proizvodnje na industrijsko mjerilo. Kod uvećanja proizvodnje nanoemulzija niskoenergetskim metodama na industrijsko mjerilo potrebno je zadržati geometrijsku sličnost korištenog pribora (čase i magnetskog mješača) te istu brzinu miješanja i dodavanja pojedinih komponenata kako bi se omogućio odgovarajući fazni prijelaz, stoga su za uspješno uvećanje proizvodnje na industrijsko mjerilo potrebna opsežna i dugotrajna istraživanja. Najčešće korištene niskoenergetske metode su metoda spontanog emulgiranja i metoda inverzije faza uslijed promjene temperature ili sastava (slika 7) (40, 70, 71).



Slika 7. Shematski prikaz pripreme nanoemulzija niskoenergetskim metodama (uz dozvolu *Elsevier*-a preuzeto i prilagođeno iz reference (61)).

1.3.3.2.1. Metoda spontanog emulgiranja

Metoda spontanog emulgiranja provodi se vrlo jednostavno: nanoemulzija nastaje miješanjem uljne i vodene faze pri sobnoj temperaturi. Bit je u tome da se u uljnu fazu dodaje organsko otapalo u kojem su topljive sve komponente uljne faze, a koje se miješa s vodom, odnosno vodenom fazom nanoemulzije. Uslijed miješanja uljne i vodene faze organsko otapalo brzo prelazi iz uljne faze u vodenu. Tim brzim prijelazom organskog otapala nastaju turbulencije na granici faza, što omogućuje formiranje vrlo sitnih kapljica. Povećanjem udjela organskog otapala moguće je postići veće smanjenje veličine kapljica disperzne faze. Organsko otapalo potrebno je na kraju ukloniti otparavanjem. Nedostaci ove metode su mogućnost zaostajanja manjih količina organskog otapala, što može biti vrlo neprikladno za oftalmičku primjenu, te mogućnost uklapanja vrlo malog udjela uljne faze (51, 70, 72).

1.3.3.2.2. Metode inverzije faza

Metode inverzije faza, u koje ubrajamo metodu inverzije faza uslijed promjene temperature (engl. *phase inversion temperature*, PIT) i metodu inverzije faza uslijed promjene sastava (engl. *phase inversion composition*, PIC), koriste energiju nastalu pri faznom prijelazu za stvaranje kapljica nanometarskih veličina (70).

1.3.3.2.2.1. Metoda inverzije faza uslijed promjene temperature

PIT metoda temelji se na promjeni topljivosti površinski aktivnih tvari s promjenom temperature, stoga je kod ove metode izbor površinski aktivnih tvari ograničen samo na višestruko etoksilirane neionske površinski aktivne tvari (primjerice Solutol® HS 15, Cremophor® RH 40, Tween® 80, Brij™ 30, Brij™ O3, Brij™ O20), čija se topljivost mijenja u ovisnosti o temperaturi (73–76). Takve su površinski aktivne tvari pri nižim temperaturama topljive u vodi zbog hidratacije višestruko etoksiliranih lanaca. Povišenjem temperature dolazi do dehidratacije, stoga se njihova topljivost u vodi postupno smanjuje. Pri određenoj prijelaznoj temperaturi topljivost površinski aktivnih tvari u vodenoj fazi jednaka je topljivosti u uljnoj fazi, zbog čega je površinska napetost na granici faza izuzetno mala pa emulzija U/V tipa prelazi u bikontinuiranu emulziju. Daljnjim povećanjem temperature površinski aktivna tvar postaje sve topljivija u uljnoj fazi te dolazi do inverzije faza i nastanka emulzije V/U tipa. Nastajanje nanoemulzije U/V tipa potiče se naglim hlađenjem sustava, pri čemu se uslijed brzog prijelaza površinski aktivnih tvari iz uljne faze u vodenu stvaraju kapljice nanometarskih veličina. Za uspješnost pripreme nanoemulzija PIT metodom sustav je potrebno zagrijati na temperaturu koja

je veća ili jednaka prijelaznoj temperaturi, dok postupak hlađenja mora biti izuzetno brz kako bi nastale kapljice bile male i ujednačenih veličina. Zbog neizbježnosti izlaganja sustava povišenim temperaturama, metoda nije prikladna za pripravu nanoemulzija s termoosjetljivim djelatnim tvarima (70, 72).

1.3.3.2.2. Metoda inverzije faza uslijed promjene sastava

Kod PIC metode, fazni prijelaz koji omogućuje nastajanje nanoemulzije događa se uslijed promjene sastava, odnosno dodatka vodene faze u smjesu ulja i površinski aktivnih tvari koje su u tom ulju otopljene. U početku nastaje mikroemulzija V/U tipa te je površinska napetost na granici faza izuzetno mala. Daljnjim dodatkom vodene faze nastupa inverzija faza i nastaje nanoemulzija U/V tipa. Kako se PIC metoda provodi pri sobnoj temperaturi, prikladna je za uklapanje termoosjetljivih djelatnih tvari u nanoemulziju te je, u odnosu na PIT metodu, prikladnija za uvećanje proizvodnje na industrijsko mjerilo (70).

1.3.4. Sterilizacija nanoemulzija

Prema definiciji Europske farmakopeje, kapi za oko su sterilne vodene ili uljne otopine, emulzije ili suspenzije jedne ili više djelatnih tvari namijenjene za primjenu na oko (77). Mnogo je zabilježenih slučajeva infekcije oka nakon primjene mikrobiološki kontaminiranih kapi za oko. Najčešće su kontaminacije bakterijama roda *Staphylococcus*, no moguće su i kontaminacije bakterijom *Pseudomonas aeruginosa*, koja može izazvati ozbiljne infekcije rožnice te dovesti do potpunog gubitka vida unutar 24-48 sati (78). Kad god je primjenjivo, provodi se sterilizacija gotovog proizvoda u spremniku u kojem se čuva sve do početka upotrebe. Za tekuće pripravke na vodenoj osnovi Europska farmakopeja kao metodu izbora navodi sterilizaciju zasićenom vodenom parom pod tlakom (autoklaviranje). Za uspješnost sterilizacije pripravak se izlaže temperaturi od najmanje 121 °C tijekom najmanje 15 minuta (79). Preduvjet za provođenje navedene metode je odgovarajuća stabilnost formulacije i spremnika pod primijenjenim uvjetima sterilizacije (78). U slučaju kada sterilizacija zasićenom vodenom parom pod tlakom nije moguća, provodi se sterilizacija filtracijom. U tu se svrhu koriste filteri čija je veličina pora 0,22 µm ili manja kako bi omogućili odstranjivanje bakterija iz formulacije. Filtracija se provodi u aseptičkim uvjetima, pri čemu se sterilizirani pripravak puni u sterilne spremnike koji se zatim zatvaraju. Tijekom proizvodnje pripravka koji je u konačnici potrebno sterilizirati filtracijom potrebno je poduzeti posebne mjere opreza kako bi se kontaminacija pripravka mikroorganizmima svela na najmanju moguću mjeru, a posebice zato što viruse nije moguće odstraniti filtracijom (78, 79). U slučaju kada sterilizacija

filtracijom također nije moguća provodi se aseptička priprava, kod koje je potrebno sterilizirati sve djelatne i pomoćne tvari koje ulaze u sastav formulacije, kao i sav pribor i spremnike koji se tijekom priprave koriste, što značajno komplicira sam postupak i povećava troškove proizvodnje (79). Kao prikladne metode sterilizacije nanoemulzija u literaturi se spominju sterilizacija zasićenom vodenom parom pod tlakom (17, 47) i sterilizacija filtracijom (80).

1.3.5. Stabilnost nanoemulzija

1.3.5.1. Nanoemulzije, makroemulzije i mikroemulzije

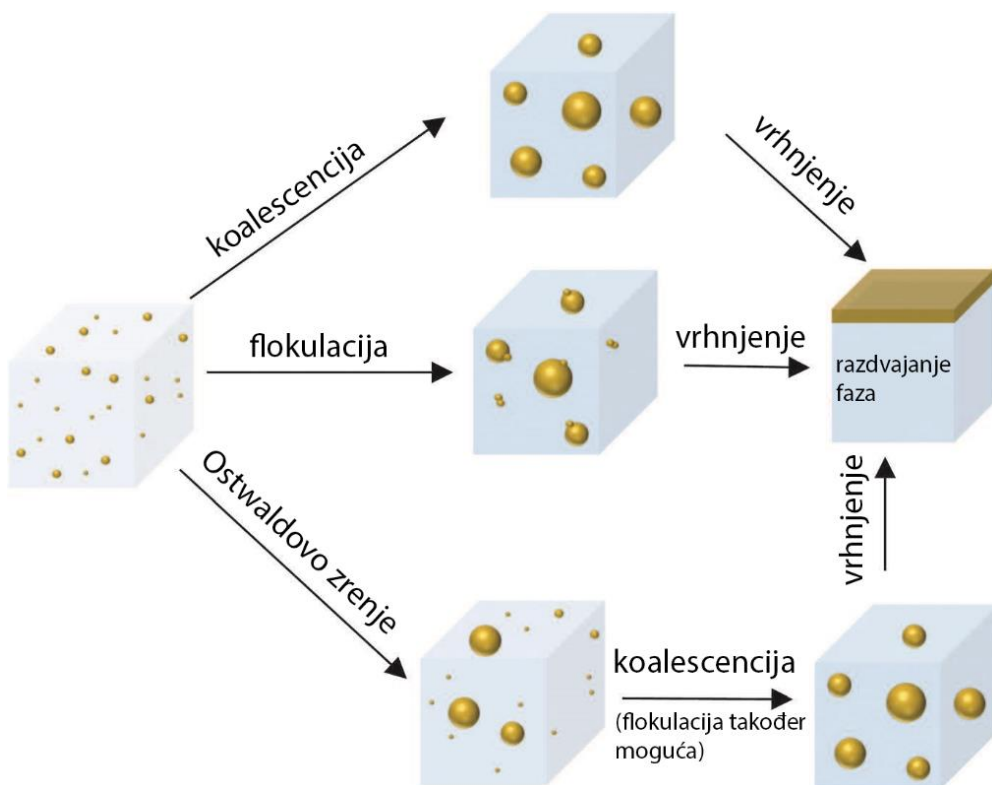
Poput klasičnih makroemulzija nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi jer ne nastaju spontano te je za njihovo nastajanje potrebno uložiti energiju. Ipak, prednost nanoemulzija pred makroemulzijama, čija je veličina kapljica 1-100 μm , je njihova kinetička stabilnost koja je posljedica utroška velike količine energije i generiranja vrlo sitnih kapljica unutarnje faze. Time su značajno usporeni klasični mehanizmi destabilizacije makroemulzija (flokulacija, vrhnjenje/sedimentacija i koalescencija), stoga nastala nanoemulzija može ostati stabilna mjesecima pa čak i godinama (39, 68). U literaturi se nanoemulzije često pogrešno nazivaju mikroemulzijama i obrnuto. Glavni sastojci mikroemulzija su, kao i kod nanoemulzija, ulje, voda i površinski aktivne tvari. Ipak, zbog znatno većih koncentracija površinski aktivnih tvari, mikroemulzije nastaju spontano, odnosno bez utroška energije. Iznad kritične micelizacijske koncentracije površinski aktivne tvari spontano se organiziraju u micle unutar čije se hidrofobne unutrašnjosti uklapaju male količine ulja te nastaju tzv. izbubrene micle veličine 10-100 nm, što pridonosi transparentnom izgledu mikroemulzija. Povećanjem koncentracije površinski aktivnih tvari unutarnja struktura mikroemulzija može poprimiti različite oblike (izdužene (engl. *worm – like*), bikontinuirane, strukture tekućih kristala ili heksagonalne). U pripravi mikroemulzija redosljed dodavanja sastojaka nema nikakav utjecaj na konačan izgled i svojstva pripravka, dok sastav i temperatura imaju. Zbog toga su mikroemulzije izuzetno osjetljive na razrjeđivanje vodom jer se promjenom sastava pomiče i ravnoteža sustava, što uzrokuje promjene u unutarnjoj strukturi te, u konačnici, raspad mikroemulzije. To svojstvo iznimno je važno kod priprave mikroemulzija za, primjerice, parenteralnu ili oftalmičku primjenu jer se mikroemulzija pri primjeni razrjeđuje plazmom, odnosno suznom filmom, a mijenja se i temperatura, što značajno utječe na stabilnost sustava. Za razliku od mikroemulzija, nanoemulzije nisu termodinamički stabilne jer sadrže manje površinski aktivnih tvari. Redosljed dodavanja sastavnica u pripravi nanoemulzija je bitan, a zahvaljujući kinetičkoj stabilnosti moguće ih je razrjeđivati vodom bez utjecaja na njihovu

unutarnju strukturu. Zbog svega navedenog nanoemulzije posjeduju manji iritacijski potencijal u odnosu na mikroemulzije (39, 68).

1.3.5.2. Mehanizmi destabilizacije nanoemulzija

Nakon određenog vremena nanoemulzija će se raspasti, što je posljedica istovremenog djelovanja nekoliko mehanizama destabilizacije: Ostwaldovog zrenja, flokulacije, vrhnjenja ili sedimentacije i koalescencije. Navedeni mehanizmi shematski su prikazani slikom 8. Najznačajniji mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje. Ostwaldovo zrenje je difuzijski proces koji nastaje zbog razlike u kemijskom potencijalu kapljica unutarnje faze različitih veličina. Kemijski potencijal kapljica unutarnje faze je veći što su kapljice manje, što uzrokuje prijenos mase od manjih kapljica prema većim difuzijom molekula unutarnje faze kroz vanjsku i posljedični rast većih kapljica na uštrb manjih (40, 68). Ostwaldovo zrenje moguće je ubrzati izlaganjem nanoemulzija povišenim temperaturama jer se pri višoj temperaturi najčešće povećavaju topljivost i brzina difuzije unutarnje faze u vanjskoj. Imajući to na umu, Ostwaldovo zrenje moguće je spriječiti, odnosno usporiti čuvanjem nanoemulzija pri nižim temperaturama, odabirom unutarnje faze čija je topljivost u vanjskoj fazi izrazito mala te pripremom nanoemulzija s uskom raspodjelom veličina kapljica. Od velikog je značaja i odabir koncentracije površinski aktivnih tvari jer se smatra da su pri većim koncentracijama površinski aktivnih tvari u vanjskoj fazi nanoemulzije prisutne micle koje povećavaju topljivost unutarnje faze u vanjskoj, čime se proces Ostwaldovog zrenja ubrzava (68). Ostali mehanizmi destabilizacije nanoemulzija postaju značajni tek nakon porasta veličine kapljica unutarnje faze mehanizmom Ostwaldovog zrenja. Flokulacija je proces kod kojeg se kapljice unutarnje faze udružuju u veće nakupine zbog djelovanja privlačnih sila te se zajedno gibaju kao jedan entitet. Flokulacija može biti reverzibilna, ali i ireverzibilna u slučaju kada su odbojne sile između kapljica izrazito slabe. Za vrijeme ireverzibilne flokulacije kapljice ostvaruju bliski kontakt, da bi se u konačnici spojile u veće kapljice mehanizmom koalescencije. Ipak, nanoemulzije su, za razliku od makroemulzija, prilično otporne na flokulaciju i posljedičnu koalescenciju zbog jačeg steričkog odbijanja između kapljica koje je posljedica veće debljine sloja površinski aktivnih tvari oko kapljica (oko 10 nm) u odnosu na veličinu kapljica (68, 81). Vrhnenje je proces u kojem se kapljice unutarnje faze nakupljaju na površini nanoemulzije zbog razlike u gustoći između unutarnje i vanjske faze. U slučaju kada je gustoća unutarnje faze veća od gustoće vanjske faze, umjesto vrhnjenja moguća je sedimentacija kapljica. Vrhnenje je reverzibilan proces kod kojeg je tek blagim potresanjem nanoemulziju moguće vratiti u prvobitno stanje. Ipak, pojava vrhnjenja kod nanoemulzija je nepoželjna jer se time smanjuje

udaljenost između kapljica, što povećava vjerojatnost koalescencije i, u konačnici, raspada nanoemulzije. Kod nanoemulzija kapljice su toliko male da Brownovo gibanje nadjačava gravitaciju, stoga vrhnjenje postaje značajno tek kada kapljice dovoljno narastu nekim od ostalih mehanizama destabilizacije (68, 82). Kod koalescencije se porast veličine kapljica događa zbog spajanja dvaju manjih kapljica u jednu veću, kao posljedice sudara kapljica. Koalescencija je ireverzibilan proces te u konačnici dovodi do razdvajanja faza i raspada nanoemulzije. Spomenuti se mehanizmi destabilizacije unutar nanoemulzije u manjoj ili većoj mjeri događaju istovremeno te utječu jedan na drugi. Raspad nanoemulzije moguće je spriječiti, odnosno odgoditi korištenjem površinski aktivnih tvari koje oko kapljica stvaraju dovoljno debeo sloj zbog kojeg se kapljice međusobno sterički odbijaju, ili pak korištenjem nabijenih (pozitivno ili negativno) površinski aktivnih tvari, čime kapljice na svojoj površini poprimaju dovoljno negativan ili pozitivan naboj te se zbog istovrsnog naboja međusobno elektrostatski odbijaju (40, 68, 83).



Slika 8. Shematski prikaz mehanizama destabilizacije nanoemulzija (preuzeto iz reference (68)).

1.3.6. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija

Osim odabira djelatne tvari u odgovarajućem udjelu te odabira vrste i udjela pomoćnih tvari, za učinkovitost nanoemulzija u liječenju bolesti suhog oka ključnu ulogu imaju i fizičko-kemijska svojstva formulacije. Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzije mogu značajno utjecati na stabilnost formulacije, brzinu oslobađanja djelatne tvari te njezinu posljedičnu apsorpciju i raspodjelu u tkiva oka, kao i na ugodnost primjene. S obzirom na to, FDA je propisala posebne smjernice za utvrđivanje bioekvivalencije generičkih lijekova za kapi za oko Restasis[®], iz kojih je očito da je Restasis[®] prepoznat kao vrlo kompleksan sustav, stoga bioekvivalenciju nije moguće dokazati samo na temelju iste vrste i udjela djelatne i pomoćnih tvari. Jedna od stavki za dokazivanje bioekvivalencije je detaljna fizičko-kemijska karakterizacija koja uključuje određivanje raspodjele veličina kapljica, zeta-potencijala, pH, viskoznosti, osmolarnosti, površinske napetosti te raspodjele djelatne tvari unutar same formulacije (43, 84).

1.3.6.1. Raspodjela veličina kapljica

Raspodjela veličina kapljica temeljno je fizičko-kemijsko svojstvo nanoemulzija koje ih razlikuje od klasičnih makroemulzija, a može imati značajan utjecaj na njihov klinički učinak. Pretpostavlja se da se smanjenjem veličine kapljica nanoemulzije povećava brzina oslobađanja djelatne tvari u suznom filmu zbog veće ukupne površine na granici faza, što posljedično povećava brzinu apsorpcije djelatne tvari u tkiva oka (17, 84, 85). Osim toga, manje kapljice pridonose transparentnijem izgledu nanoemulzije, čime se smanjuje zamućenje vida nakon primjene (40). Kapljice unutarnje faze nanoemulzije nikada nisu u potpunosti jednake, već su prisutne u različitim veličinama, stoga se veličina kapljica izražava kao prosječna veličina kapljica. Prosječna veličina kapljica nanoemulzija najčešće se mjeri tehnikom dinamičkog raspršivanja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), čiji je drugi naziv fotonska korelacijska spektroskopija (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS). DLS tehnika temelji se na Brownovom gibanju kapljica: male kapljice gibaju se brže od velikih kapljica. Uzorak nanoemulzije obasjava se laserom, pri čemu se svjetlost raspršuje na kapljicama unutarnje faze nanoemulzije. Kod kapljica koje se gibaju brže veće su fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti. Uređaj mjeri fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti te na temelju toga, pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe, računa veličinu kapljica (69, 86). Uz veličinu kapljica navodi se i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) kao mjera rasapa veličina kapljica nanoemulzije oko prosječne vrijednosti (86). PDI kreće se od 0, za potpuno ujednačene, monodisperzne nanoemulzije, do 1, za polidisperzne nanoemulzije čije su kapljice unutarnje

faze prisutne u vrlo različitim veličinama. S obzirom na to da nije moguće postići potpunu ujednačenost veličina kapljica, nanoemulzije se smatraju monodisperznima kada je njihov PDI manji od 0,2 (40). Kao dodatne tehnike za karakterizaciju nanoemulzija, koje omogućuju vizualizaciju te utvrđivanje veličine i morfologije kapljica, najčešće se koriste tehnike pretražne elektronske mikroskopije, poput transmisijske elektronske mikroskopije (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) i skenirajuće elektronske mikroskopije (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) te mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) (87, 88).

1.3.6.2. Zeta-potencijal

Naboj na površini kapljica značajno utječe na interakciju nanoemulzije s površinom oka te posljedično na vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene (84). Naboj na površini kapljica nanoemulzije određuje se mjerenjem zeta-potencijala (40). Zeta-potencijal je potencijal smješten na plohi smicanja između električnog dvosloja kapljice, koja se kreće pod utjecajem električnog polja, i okolnog medija. Zeta-potencijal se ne mjeri izravno, već se računa iz elektroforetske pokretljivosti kapljica pomoću Henry-jeve jednadžbe. Elektroforetsko raspršivanje svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) najčešće je korištena tehnika za određivanje zeta-potencijala. Kapljice koje se pod utjecajem električnog polja kreću prema elektrodi suprotnog naboja obasjavaju se laserom te dolazi do raspršivanja svjetlosti. Elektroforetska pokretljivost kapljica određuje se na temelju razlike u frekvenciji između raspršene svjetlosti i originalne laserske zrake. Ta je razlika u frekvenciji proporcionalna brzini kapljica, a naziva se Dopplerovim pomakom (89). Osim za vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene, zeta-potencijal važan je i za stabilnost nanoemulzija (84). Za dugoročnu stabilnost nanoemulzija stabiliziranih dodatkom površinski aktivnih tvari male molekulske mase, koje ne pružaju dovoljnu steričku stabilizaciju, potrebna apsolutna vrijednost zeta-potencijala je 30 mV ili veća kako bi se postigla dovoljna elektrostatska stabilizacija sustava. S druge strane, kod nanoemulzija stabiliziranih površinski aktivnim tvarima veće molekulske mase, koje sustavu pružaju dovoljnu steričku stabilizaciju, apsolutna vrijednost zeta-potencijala može biti i manja jer se dugoročna stabilnost postiže kombinacijom dvaju mehanizama (61, 89).

1.3.6.3. pH

Kako bi se iritacijski potencijal nanoemulzije sveo na najmanju moguću mjeru poželjno je prilagoditi pH formulacije na pH vrijednost suznog filma (84). Prosječna pH vrijednost suznog filma je između 6,8 i 8,2, s pojedinačnim vrijednostima između 5,2 i 8,6 (5). Ipak, postizanje idealne pH vrijednosti formulacije rijetko kada je moguće jer, osim na ugodnost primjene, pH vrijednost može utjecati i na stabilnost i topljivost djelatnih i pomoćnih tvari (78). Općeprihvaćena je činjenica da se oftalmičke formulacije nižeg pH dobro podnose te da njihova primjena neće nužno izazvati osjećaj nelagode i peckanja ako se pH suznog filma može brzo vratiti na svoju fiziološku vrijednost. To je moguće postići korištenjem pufera u najmanjoj mogućoj koncentraciji ili pak potpunim izostavljanjem pufera iz formulacije (17, 78).

1.3.6.4. Viskoznost

Povećanjem viskoznosti produljuje se vrijeme zadržavanja formulacije na površini oka smanjenjem brzine eliminacije s mjesta primjene, što može pozitivno utjecati na apsorpciju i bioraspoloživost djelatne tvari. S druge strane, povećana viskoznost formulacije može smanjiti brzinu oslobađanja i difuzije djelatne tvari te usporiti njezinu apsorpciju (84). Ako se dodaju u prevelikoj koncentraciji, tvari za povećanje viskoznosti mogu uzrokovati zamućenje vida te zaostajati na vjeđama nakon primjene. Također, povećana viskoznost može predstavljati problem kod formulacija koje se steriliziraju filtracijom (78).

1.3.6.5. Osmolarnost

Poput pH vrijednosti, osmolarnost također utječe na ugodnost primjene formulacije na oko. Fiziološke su vrijednosti osmolarnosti suznog filma između 270 i 315 mOsm kg⁻¹ (5). Ipak, oko dobro podnosi pripravke puno šireg raspona osmolarnosti te se smatra da vodene otopine koje sadrže 0,5-1,8 % NaCl, što odgovara osmolarnosti 171-616 mOsm kg⁻¹, neće izazvati neugodan osjećaj nakon primjene (78). Klinička studija na 5 zdravih ispitanika kojima su primjenjivane kapi za oko rastuće osmolarnosti pokazala je da granična vrijednost osmolarnosti kapi za oko, nakon koje ispitanici počinju osjećati nelagodu, iznosi 454 mOsm kg⁻¹ (90). Smatra se da kod bolesti suhog oka primjena hipotoničnih kapi za oko može imati povoljan učinak smanjujući hiperosmolarnost suznog filma, no potrebna su dodatna istraživanja kojima bi se ispitao učinak takvih kapi za oko na znakove i simptome bolesti (15).

1.3.6.6. Površinska napetost

Površinska napetost bitno je svojstvo koje utječe na širenje i zadržavanje formulacije na površini oka te na ugodnost primjene (91). Površinska napetost normalnog suznog filma iznosi 40,9-46,3 mN m⁻¹, dok su kod bolesti suhog oka izmjerene veće vrijednosti (47,4-51,8 mN m⁻¹) koje se povezuju sa smanjenom stabilnošću suznog filma (5). Formulacija manje površinske napetosti mogla bi, stoga, povećati stabilnost suznog filma kod osoba oboljelih od suhog oka. Ipak, unatoč poboljšanju svojstava širenja po površini oka, smanjenje površinske napetosti formulacije može ubrzati njezino uklanjanje putem suznonosnog kanala (85), a poznato je i da primjena kapi za oko čija je površinska napetost manja od 35 mN m⁻¹ može izazvati osjećaj boli i nelagode (91, 92). Uzimajući u obzir sve navedeno, formulacija čija je površinska napetost manja od površinske napetosti suznog filma, ali još uvijek veća od 35 mN m⁻¹, mogla bi imati povoljan učinak na stabilizaciju suznog filma kod bolesti suhog oka.

1.3.6.7. Učinkovitost uklapanja djelatne tvari

Raspodjela djelatne tvari unutar nanoemulzije ovisi o fizičko-kemijskim svojstvima djelatne i pomoćnih tvari, ali i o načinu pripreme nanoemulzije, odnosno o procesnim parametrima. Iako utjecaj raspodjele djelatne tvari unutar nanoemulzije na djelotvornost i sigurnost primjene nije u potpunosti razjašnjen, raspodjelu djelatne tvari potrebno je ispitati jer može utjecati na oslobađanje, apsorpciju i raspodjelu djelatne tvari u različita tkiva oka. Ispitivanje na humanim epitelnim stanicama rožnice pokazalo je da se udio djelatne tvari (ciklosporina A) koja ulazi u epitelne stanice rožnice povećava sa smanjenjem frakcije djelatne tvari sadržane u vodenoj fazi nanoemulzije (43). Jednostavan način za određivanje raspodjele djelatne tvari unutar nanoemulzije je određivanje učinkovitosti uklapanja. Učinkovitosti uklapanja odnosi se na postotak djelatne tvari koja je uklopljena unutar uljnih kapljica nanoemulzije, u odnosu na ukupni sadržaj djelatne tvari u formulaciji, a može se odrediti izravno (određivanjem sadržaja uklopljene djelatne tvari u unutarnjoj fazi nanoemulzije) ili neizravno (određivanjem sadržaja neuklopljene djelatne tvari u vanjskoj fazi nanoemulzije). Prije samog određivanja sadržaja djelatne tvari potrebno je odvojiti uljnu od vodene faze nanoemulzije, što je moguće postići centrifugiranjem pri velikim brzinama okretaja ili centrifugiranjem kroz hidrofilnu membranu na kojoj zaostaju uljne kapljice nanoemulzije (43, 93, 94).

1.3.7. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

Stabilnost nanoemulzija moguće je ispitati pohranom u realnom vremenu tijekom 3-6 mjeseci pri 4 ili 25 °C, tijekom koje se povremeno ispituju izgled i fizičko-kemijska svojstva formulacija, a postoje i posebni testovi kojima se ispituje otpornost nanoemulzija na temperaturne promjene koje, primjerice, mogu nastati tijekom prijenosa ili čuvanja. Ti se testovi provode tako da se nanoemulzija podvrgne ciklusima zagrijavanja i hlađenja te ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja, nakon čega se ponovno ispituju njezin izgled i fizičko-kemijska svojstva. Testom kinetičke stabilnosti utvrđuje se otpornost nanoemulzija na vrhljenje ili sedimentaciju te koalescenciju i razdvajanje faza. Test se provodi tako da se nanoemulzija podvrgne centrifugiranju pri velikim brzinama okretaja, nakon čega se, kao i kod prethodnih testova, ispituju njezin izgled i fizičko-kemijska svojstva (40, 61).

1.3.8. Biofarmaceutska karakterizacija nanoemulzija

Biofarmaceutska karakterizacija omogućuje predviđanje ponašanja i kliničkog učinka nanoemulzija simulacijom određenih uvjeta na mjestu primjene. Kod nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka cilj je pripremiti biokompatibilnu formulaciju produljenog zadržavanja na površini oka, tijekom kojeg se djelatna tvar oslobađa u suznom filmu kontroliranom brzinom, a zatim apsorbira u epitelne stanice rožnice i spojnice oka gdje ispoljava svoj klinički učinak.

1.3.8.1. Ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene nanoemulzija

Već je u ranim fazama razvoja formulacije potrebno ispitati njezinu sigurnost primjene na oko. Površinski aktivne tvari neophodne za pripremu i stabilnost nanoemulzija već se dugo koriste u kapima za oko. Ipak, poznato je da se mogu nespecifično vezati za staničnu membranu uzrokujući njezinu fluidizaciju, što je povezano s povećanjem permeabilnosti stanične membrane, ali i s o koncentraciji ovisnim toksičnim učinkom površinski aktivnih tvari (95), stoga je nužno utvrditi siguran raspon koncentracija korištenih površinski aktivnih tvari. Također, kod pripreme kationskih nanoemulzija potrebno je utvrditi netoksičnost, odnosno siguran raspon koncentracija odabranog nositelja pozitivnog naboja. Draize test je standardni test za utvrđivanje akutne očne toksičnosti tvari ili pripravaka koji je prihvaćen od strane regulatornih tijela, a provodi se na animalnom modelu oka kunića. Razvijen je 1940-ih godina od strane FDA kao odgovor na nove zakone donesene zbog trajnih oštećenja oka korisnika određenih kozmetičkih proizvoda. Ipak, unatoč dugoj povijesti primjene, Draize test često nailazi na kritike zbog svoje subjektivne naravi, nedostatne ponovljivosti, dugotrajnosti,

korištenja prevelikih doza te anatomskih i fizioloških razlika između ljudskog oka i oka kunića. Također, iz etičkih razloga i borbe za prava životinja danas se potiče razvoj i korištenje alternativnih modela koji ne uključuju ispitivanje na životinjama (96). Znanstveni napredak na području tehnologije kultura stanica omogućio je razvoj *in vitro* modela koji se, uz *ex vivo* modele koji koriste izolirani organ životinjskog porijekla, mogu koristiti u ispitivanju sigurnosti oftalmičke primjene (96, 97). Iako još uvijek ne postoji jedinstvena zamjena za Draize test, korištenjem *in vitro* modela s mogućnošću ispitivanja velikog broja uzoraka u jedinici vremena za primarni probir te *ex vivo* modela veće prediktivne sposobnosti za sekundarni probir formulacija moguće je značajno smanjiti broj životinja korištenih u pretkliničkim ispitivanjima (98).

1.3.8.1.1. *In vitro* modeli

Stanični *in vitro* modeli koristan su alat za predviđanje toksičnosti, odnosno iritacijskog potencijala formulacija za oftalmičku primjenu. Njihova prednost pred *in vivo* i *ex vivo* modelima je jednostavnost, brzina uzgoja i provedbe ispitivanja te relativno niski troškovi, a korištenjem staničnih linija humanog porijekla izbjegavaju se problemi s tumačenjem dobivenih rezultata zbog varijabilnosti između vrsta. Također, ponovljivost dobivenih rezultata veća je u odnosu na ponovljivost rezultata dobivenih ispitivanjima *in vivo* i *ex vivo* (96, 99). Osim toga, stanični *in vitro* modeli omogućuju primjenu različitih koncentracija ispitivane formulacije, kao i različitih vremena izlaganja te omogućuju utvrđivanje mehanizma toksičnog djelovanja na staničnoj ili molekularnoj razini (96). HCE-T imortalizirana stanična linija humanog epitela rožnice danas je najokarakteriziranija stanična linija epitela rožnice, a dobivena je izolacijom epitelnih stanica rožnice četrdesetdevetogodišnje žene koja je umrla od karcinoma maksilarnog sinusa. Izolirane primarne stanice zatim su imortalizirane pomoću rekombinantnog SV40 adenovirusnog vektora (98–100). HCE-T model epitela rožnice uzgaja se na posebnim pločama za uzgoj stanica kod kojih propusna membrana odvaja donorski i receptorski odjeljak. Stanice se nasađuju u donorski odjeljak na propusnu membranu te se uzgajaju uronjene u staničnom hranidbenom mediju tijekom nekoliko dana, odnosno do postizanja konfluentnog monosloja stanica i stvaranja čvrstih spojeva između stanica. Sljedeći korak je izlaganje stanica zraku uklanjanjem medija iz donorskog odjeljka, pri čemu propusna membrana omogućuje prehranu stanica medijem iz receptorskog odjeljka, čime se bolje oponaša metabolička aktivnost stanica *in vivo*. Izlaganje stanica zraku ključno je za diferencijaciju i stvaranje višeslojnog epitela, karakteristika sličnih epitelu humane rožnice (98, 99, 101). Takav trodimenzionalni (3D) model vjerodostojnije odražava stvarnu strukturu epitela

rožnice *in vivo* u odnosu na dvodimenzionalne (2D) modele staničnih monoslojeva koji se još uvijek često koriste u ispitivanjima, unatoč tome što rezultati dobiveni na 2D modelima mogu navesti na donošenje pogrešnih zaključaka o toksičnosti ispitivane formulacije.

Kod *in vitro* modela stupanj preživljenja stanica nakon izlaganja ispitivanoj formulaciji izražava se kao vijabilnost stanica. Postoje različiti testovi za ispitivanje vijabilnosti stanica, a moguće ih je podijeliti na testove isključenja bojom, kolorimetrijske, fluorimetrijske i luminometrijske testove. Testovi isključenja bojom temelje se na ulasku boje u mrtve stanice, što je omogućeno narušenim integritetom stanične membrane. Najčešće korištena boja je tripansko modriilo. Kolorimetrijski testovi temelje se na dodatku reagensa koji se pomoću određenog biokemijskog pokazatelja metaboličke aktivnosti stanica prevodi u obojeni produkt, čiju je koncentraciju moguće izmjeriti spektrofotometrijski. Jedan od najčešće korištenih kolorimetrijskih testova je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolijbromid) test kojim se određuje aktivnost mitohondrijskih sukcinat dehidrogenaza prisutnih u metabolički aktivnim, odnosno živim stanicama. Test određivanja koncentracije laktat dehidrogenaze (LDH) i test unosa neutralno crvene boje (engl. *neutral red uptake*, NRU) također su često korišteni kolorimetrijski testovi. LDH testom kvantitativno se određuje citoplazmatski enzim LDH prisutan u staničnom hranidbenom mediju kao indikator oštećenja i povećanja propusnosti stanične membrane, odnosno stanične smrti. NRU test temelji se na ulasku i zadržavanju boje u lizosomima živih stanica, što je posljedica protonacije boje u kiselom sadržaju lizosoma. Fluorimetrijski testovi, poput kolorimetrijskih, ispituju aktivnost određenog enzima kao pokazatelja vijabilnosti stanica dodatkom reagensa koji se pomoću tog enzima prevodi u fluorescentni produkt. Test redukcije resazurina ili alamarBlue[®] test temelji se na redukciji plavog nefluorescentnog reagensa resazurina do ružičastog fluorescentnog rezofurina pomoću mitohondrijskih i drugih staničnih enzima. Luminometrijski testovi vrlo su osjetljivi, a temelje se na mjerenju luminescencije nakon dodatka određenog reagensa. Kod testa određivanja koncentracije adenzin trifosfata (ATP), koji se sintetizira samo u živim stanicama, enzim luciferaza u prisutnosti iona magnezija katalizira reakciju između ATP-a i luciferina, pri čemu nastaje luminescentni produkt oksiluciferin (96, 102).

1.3.8.1.2. *Ex vivo* modeli

Kao *ex vivo* model za ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene formulacija najčešće se koristi izolirano oko ili rožnica životinjskog porijekla (govedo, svinja, kunić ili pile). Očne jabučice moguće je nabaviti u klaonicama mesoprerađivačke industrije gdje ih se svrstava pod otpad.

Kod testa s izoliranim pilećim okom (engl. *isolated chicken eye*, ICE) izolirane pileće oči izlažu se ispitivanom uzorku tijekom 10 sekundi, a zatim se toksični učinak određuje ispitivanjem promjena u zamućenju i debljini rožnice, ispitivanjem permeabilnosti fluoresceina kroz rožnicu te utvrđivanjem makroskopskih promjena na rožnici. Kod testa zamućenja i permeabilnosti goveđe rožnice (engl. *bovine corneal opacity permeability*, BCOP) koriste se izolirane rožnice goveđeg porijekla. Rožnica se postavlja u ćeliju između donorskog i receptorskog odjeljka koji imaju otvore za primjenu ispitivanog uzorka te je tako moguće ispitati toksični učinak na epitel i endotel rožnice. Toksičnost ispitivanog uzorka određuje se s obzirom na stupanj zamućenja rožnice i permeabilnost fluoresceina kroz rožnicu (96, 97). Test zamućenja i permeabilnosti svinjske rožnice (engl. *porcine corneal opacity permeability*, PCOP) provodi se kao i BCOP test, a njegova je prednost korištenje rožnica svinje koje su anatomske sličnije ljudskim rožnicama (96).

1.3.8.1.3. Ostali organotipski modeli

Osim *ex vivo* modela, za ispitivanje sigurnosti oftalmičke primjene mogu se koristiti i organotipski modeli koji ne uključuju ispitivanje na očima ili određenim dijelovima oka. Test na kokošnjem jajetu (engl. *hen's egg test on chorioallantoic membrane*, HET-CAM) provodi se na korioalantoinskoj membrani oplodjenog kokošnjeg jajeta, čija su prokrvljenost i upalni procesi slični onima na spojnicu oka kunića. Nakon primjene ispitivanog uzorka na korioalantoinsku membranu izloženu zraku i uklanjanja uzorka ispiranjem ispituju se promjene u izgledu i morfologiji membrane. Promjene na krvnim žilama membrane, poput krvarenja, vazokonstrikcije ili vazodilatacije, ukazuju na potencijalno iritirajući učinak ispitivanog uzorka na spojnicu oka, dok koagulacija ukazuje na potencijalno oštećenje rožnice (96). Test iritacije sluznice puža golaća (engl. *slug mucosal irritation*, SMI) razvijen je za predviđanje iritacijskog potencijala formulacija ili njihovih sastojaka na sluznicu. U ispitivanjima se koriste kopneni puževi golaći vrste *Arion lusitanicus*, koje zbog ograničenog osjeta boli ne štiti zakon o provođenju ispitivanja na životinjama. Kod ovog testa puž golać stavlja se na površinu koja sadrži ispitivani uzorak. Ako uzorak djeluje iritirajuće, puž golać izlučuje mukus te mu se smanjuje masa, a kada je istovremeno prisutno i oštećenje tkiva dolazi do otpuštanja određenih proteina i enzima sa sluznice puža golaća, što omogućuje svrstavanje ispitivanih uzoraka u skupine prema iritacijskom potencijalu (96).

1.3.8.2. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz nanoemulzija

Nanoemulzije su složeni sustavi kod kojih se djelatna tvar istovremeno može nalaziti u različitim odjeljcima ili fazama. Oslobađanje djelatne tvari u suznom filmu i uspostava ravnoteže u sustavu nakon primjene na oko stoga su također vrlo složeni procesi, što predstavlja veliki izazov u razvoju prikladnih metoda za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz nanoemulzija (43). Glavnim mehanizmom oslobađanja djelatne tvari iz nanoemulzije smatra se difuzija iz uljnih kapljica u vodenu fazu, preko sloja površinski aktivnih tvari na granici faza. Smatra se da su veliki koeficijent razdjeljenja slabo topljivih djelatnih tvari između uljne i vodene faze te svojstva sloja površinski aktivnih tvari na granici faza odgovorni za odgođeno ili produljeno oslobađanje djelatnih tvari iz nanoemulzija. Također se smatra da je difuzija djelatne tvari kroz sloj površinski aktivnih tvari na granici faza ograničavajući čimbenik brzine difuzije (103). Iako još uvijek nisu razvijene farmakopejske metode za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz topikalnih oftalmičkih pripravaka, pa tako ni za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz nanoemulzija za oftalmičku primjenu, u istraživanjima se najčešće koriste metode membranske difuzije. Metode membranske difuzije trenutno se smatraju najprikladnijima za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz različitih nanosustava, poput liposoma, nanočestica, nanokristala i nanoemulzija, pri čemu je metoda s dijalizacijskom vrećicom najčešće korištena. Kod metode s dijalizacijskom vrećicom određena količina nanoemulzije stavlja se unutar dijalizacijske vrećice te se zatim uranja u medij za oslobađanje. Kod takve metode ključan je odabir dijalizacijske vrećice odgovarajuće veličine pora kako bi se omogućila difuzija djelatne tvari te istovremeno spriječila difuzija uljnih kapljica u okolni medij. Oslobađanje djelatne tvari iz nanoemulzije u okolni medij posljedica je dvaju procesa: difuzije djelatne tvari iz uljnih kapljica u vanjsku fazu nanoemulzije unutar dijalizacijske vrećice i difuzije djelatne tvari kroz pore dijalizacijske vrećice u okolni medij. Zbog fizičke odvojenosti nanoemulzije i medija za oslobađanje, uzorkovanje, nadoknađivanje medija i analiza prikupljenih uzoraka izuzetno su jednostavni. Odabir sastava, pH vrijednosti, volumena, temperature i brzine miješanja medija za oslobađanje temelji se na osiguravanju biorelevantnih uvjeta za oslobađanje, ali i na održavanju uvjeta osigurane topljivosti djelatne tvari tijekom ispitivanja (104).

1.3.8.3. Ispitivanje permeabilnosti djelatnih tvari iz nanoemulzija

Nakon topikalne oftalmičke primjene lijeka dva su najznačajnija puta apsorpcije djelatne tvari u prednju očnu sobicu: put preko rožnice i put preko bulbarne spojnice. Rožnica je glavni put

apsorpcije malih lipofilnih molekula, što je zapravo većina djelatnih tvari za oftalmičku primjenu. Nakon prelaska rožnične barijere djelatna se tvar nalazi u očnoj vodici, odakle se raspodjeljuje u okolna tkiva oka (99). Za ispitivanje permeabilnosti, odnosno transkornealne penetracije djelatnih tvari iz formulacija za oftalmičku primjenu koriste se *in vitro* stanični modeli, poput HCE-T modela humanog epitela rožnice, ili *ex vivo* modeli kod kojih se koristi svježe izolirana rožnica životinjskog porijekla. Navedeni modeli smještaju se između donorskog i receptorskog odjeljka sustava (ćelije) za ispitivanje permeabilnosti. Ispitivana formulacija dodaje se u donorski odjeljak te se tijekom višesatnog perioda određuje koncentracija djelatne tvari u receptorskom odjeljku, na temelju koje se računa prividni koeficijent permeabilnosti (engl. *apparent permeability coefficient*, P_{app}) (98, 101). Za uspješno predviđanje transkornealne penetracije *in vivo* provođenje ispitivanja u biorelevantnim uvjetima od kritične je važnosti. Biorelevantni uvjeti podrazumijevaju simuliranje sastava suza u donorskom odjeljku, simuliranje sastava očne vodice u receptorskom odjeljku te simuliranje dinamike navedenih tekućina. Ipak, većina modela za ispitivanje transkornealne penetracije djelatnih tvari još uvijek ne uzima u obzir dinamiku suza te se ispitivanja uglavnom provode u statičnim uvjetima, što dovodi u pitanje značajnost dobivenih rezultata. Procjenjuje se da nakon primjene konvencionalnih kapi za oko, zbog suzenja, treptanja i nazolakrimalne drenaže, djelatna tvar ostaje u kontaktu s površinom oka najviše 5 minuta, dok se spomenutim metodama permeabilnost ispituje tijekom nekoliko sati (98). S druge strane, karakteristike same formulacije mogu značajno utjecati na vrijeme zadržavanja u suznom filmu, odnosno na površini oka. Zbog specifičnosti strukture i sastava nanoemulzije se mogu zadržati u suznom filmu i do 4 sata nakon primjene (45), što je u slučaju kationskih nanoemulzija vjerojatno još i dulje. Ispitivanje mukoadhezivnosti formulacije može biti korisno za predviđanje vremena zadržavanja formulacije na površini oka. Kod nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka od ključne je važnosti zadržavanje i integracija sastavnica nanoemulzije sa suznim filmom te apsorpcija djelatne tvari u epitelne stanice rožnice i spojnice oka zahvaćene upalom, dok je transkornealna permeacija djelatne tvari u očnu vodicu od manjeg značaja (32). Apsorpciji djelatne tvari prethodi oslobađanje iz uljnih kapljica nanoemulzije u okolni suzni film (32, 98), stoga je u slučaju nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka procjenom brzine oslobađanja uklopljene djelatne tvari i vremena zadržavanja formulacije na mjestu primjene moguće bolje predvidjeti kliničku učinkovitosti nego ispitivanjem transkornealne penetracije djelatne tvari iz formulacije korištenjem statičnih modela.

1.3.8.4. Ispitivanje mukoadhezivnosti nanoemulzija

Mukoadhezija je definirana kao sposobnost vezanja (nano)sustava za sluznicu (mukozu) (105). Sam fenomen mukoadhezije podijeljen je u dvije faze. U prvoj fazi uspostavlja se kontakt između mukoadhezivne formulacije i sluznice, što ovisi o svojstvima širenja formulacije i međupovršinskim silama. Kod nanoemulzija za oftalmičku primjenu površinska napetost ima glavnu ulogu u širenju formulacije po površini oka. Druga faza mukoadhezije je faza integracije, kod koje dolazi do stvaranja fizičkih petlji i sekundarnih kemijskih veza između mukoadhezivnog materijala i mucina. Tijekom faze integracije dolazi do jačanja mukoadhezivne međupovršine, koju je moguće zamisliti kao sloj mucina koji se isprepliće s mukoadhezivnim materijalom (106). Kod razvoja mukoadhezivnih nanoemulzija za liječenje bolesti suhog oka jedan od ključnih koraka je vrednovanje mukoadhezivnosti pripremljene formulacije, što je moguće provesti različitim metodama. Najbolje predviđanje kliničkog učinka mukoadhezivne formulacije omogućuju *in vivo* ispitivanja na životinjama, kojima se najčešće određuje vrijeme zadržavanja mukoadhezivne formulacije na sluznici, te klinička ispitivanja. Ipak, ove metode nisu toliko često korištene zbog visokih troškova, dugotrajnosti ispitivanja te etičkih razloga (107, 108). Korištenjem pouzdanih *in vitro/ex vivo* metoda moguće je napraviti probir mukoadhezivnih formulacija te odabrati samo najbolje kandidate, čiju je mukoadhezivnost potrebno dodatno potvrditi ispitivanjima *in vivo* te kliničkim ispitivanjima.

1.3.8.4.1. Ispitivanje vlačne čvrstoće

Ispitivanje vlačne čvrstoće (engl. *tensile strength*) najčešće je korištena *in vitro/ex vivo* metoda za ispitivanje mukoadhezivnosti, a provodi se pomoću teksturnog analizatora. Na podlogu uređaja nanose se supstrat (sluznica životinjskog porijekla, gel mucina, komprimirani mucinski disk ili filter papir namočen u otopinu mucina) i ispitivani uzorak te se zatim komprimiraju određenom silom pomoću sonde određenog promjera. Nakon toga, sonda se podiže određenom brzinom te se mjeri sila koja je potrebna za odvajanje uzorka od supstrata (107, 108). Ispitivanjem vlačne čvrstoće najčešće se ispituje mukoadhezivnost različitih polimera (suhih ili hidratiziranih u obliku gela) te suhих polimernih filmova, mikročestica ili tableta. Ipak, metoda nije prikladna za ispitivanje mukoadhezivnosti tekućih uzoraka (107). Kako su nanoemulzije za oftalmičku primjenu tekući sustavi male viskoznosti, potreban je odabir alternativnih metoda za ispitivanje mukoadhezivnosti.

1.3.8.4.2. Metoda s protočnom ćelijom

Kod metode s protočnom ćelijom ispituje se sposobnost mukoadhezivnog sustava da ostane vezan za sluznicu primjenom kontinuiranog protoka tekućine (npr. fosfatnog pufera), čime se sustav ispire sa sluznice. U ispitivanjima se koristi svježe izolirana sluznica životinjskog porijekla pričvršćena za protočnu ćeliju, a za procjenu mukoadhezivnosti određuje se udio ispitivanog sustava koji je zaostao na sluznici nakon ispitivanja ili vrijeme koje je potrebno za potpuno ispiranje sustava sa sluznice (107).

1.3.8.4.3. Mikroskopija atomskih sila

Mikroskopija atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM) je tip pretražne mikroskopije vrlo velike rezolucije, pomoću koje je moguće snimiti trodimenzionalni prikaz površine te izmjeriti interakcije mukoadhezivnog materijala i mucina na molekularnoj razini. AFM je osjetljiva tehnika koja ne zahtijeva složenu pripremu uzorka prije mjerenja (105, 107).

1.3.8.4.4. Reološke metode

Ispreplitanje lanaca mukoadhezivnog polimera i lanaca mucina uzrok je promjene reoloških svojstava sustava, što označava nastanak mukoadhezivne interakcije, a temelj je reoloških metoda za ispitivanje mukoadhezije. Kod ovih se metoda umjesto sluznice životinjskog porijekla koristi svježe izolirani mukus ili otopina/disperzija komercijalno dostupnih mucina, koje je prije mjerenja potrebno pomiješati s ispitivanim polimerom (106). U svrhu mjerenja mogu se koristiti rotacijski ili oscilacijski testovi. Rotacijskim testovima mjeri se viskoznost u ovisnosti o brzini smicanja, a oscilacijskim testovima ovisnost modula pohrane i modula gubitka o primijenjenoj frekvenciji. Jednostavna reološka metoda razvijena 1990. godine temelji se na sinergističkom porastu viskoznosti sustava nakon miješanja disperzije mucina s otopinom ispitivanog polimera (109). Porast viskoznosti uzrokovan interakcijom polimera i mucina izražen je kao komponenta viskoznosti zbog bioadhezije, a služi kao izravna procjena sile bioadhezije. Metoda se pokazala prikladnom i za ispitivanje mukoadhezivnosti kationskih mikroemulzija s kitozonom i deksametazonom za oftalmičku primjenu (110). Kod viskoelastičnih sustava modul pohrane (G') predstavlja unutarnju energiju sustava koja se obnavlja nakon prestanka djelovanja sile na sustav (elastična komponenta sustava), a modul gubitka (G'') predstavlja unutarnju energiju sustava koja se gubi djelovanjem sile na sustav (viskozna komponenta sustava). Oscilacijskim testovima za ispitivanje mukoadhezivnosti polimera mjeri se G' i G'' u ovisnosti o frekvenciji u linearnom viskoelastičnom području, unutar

kojeg ne dolazi do narušavanja strukture sustava. Porast G' i G'' nakon miješanja polimera s otopinom/disperzijom mucina ili mukusom upućuje na nastanak mukoadhezivnih veza. Porast G' služi kao kvantitativna mjera snage mukoadhezivnih interakcija. Tangens gubitka ($\tan\delta$), koji označava omjer G'' i G' , također može služiti kao mjera mukoadhezije. Kada je $\tan\delta$ manji od 1 znači da prevladava elastična komponenta sustava, dok za $\tan\delta$ veći od 1 znači da prevladava viskozna komponenta sustava. Smanjenje $\tan\delta$ nakon miješanja ispitivanog polimera s otopinom/disperzijom mucina ili mukosom označava porast elastične komponente sustava, što je posljedica mukoadhezivnih interakcija nastalih između lanaca polimera i mucina (106, 107).

1.3.8.4.5. Ispitivanje mukoadhezivnosti mjerenjem zeta-potencijala i veličine kapljica

Metoda ispitivanja mukoadhezivnosti mjerenjem zeta-potencijala i veličine čestica (kapljica) temelji se na pretpostavci da se mukoadhezivni polimeri ili nanosustavi adsorbiraju na površinu sluznice, pri čemu opseg adsorpcije služi kao mjera mukoadhezije. Za ispitivanje mukoadhezivnosti polimera koristi se metoda kod koje se otopina ispitivanog polimera miješa s disperzijom čestica mucina. Promjena zeta-potencijala čestica mucina nakon miješanja s otopinom polimera ukazuje na promjenu površinskih svojstava mucinskih čestica, što je posljedica adsorpcije polimernih lanaca (107). Metoda prikladna za ispitivanje mukoadhezije nanosustava temelji se na promjeni zeta-potencijala i veličine čestica (kapljica) ispitivanog nanosustava nakon inkubacije s mukusom životinjskog porijekla. Za mukoadhezivne se nanosustave očekuje pomak zeta-potencijala prema negativnijim vrijednostima te porast veličine čestica (kapljica) zbog adsorpcije negativno nabijenih mucina na površinu nanosustava (111).

1.3.8.4.6. Ispitivanje mukoadhezivnosti na staničnim kulturama

Stanične kulture također se mogu koristiti u svrhu ispitivanja mukoadhezivnosti formulacija te predstavljaju alternativu ispitivanjima *ex vivo*, kod kojih se koristi svježe izolirana sluznica životinjskog porijekla (108). Metoda na HCE-T staničnoj liniji humanog epitela rožnice razvijena je za ispitivanje mukoadhezivnosti lecitinsko/kitozanskih nanočestica s melatoninom za oftalmičku primjenu, a temelji se na smanjenju koncentracije melatonina u suspenziji nanočestica iznad sloja stanica tijekom vremena zbog adhezije nanočestica na površinu stanica (112).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolest suhog oka jedna je od najčešćih bolesti koja zahvaća površinu oka, a popraćena je povećanom osmolarnošću suznog filma i upalom. Učestalost ove bolesti u svijetu prosječno iznosi 5-50 %, a sve češće pogađa i mlađe osobe. Bolest suhog oka ozbiljno narušava kvalitetu života oboljelih, a kao posljedica neliječenja može se javiti i sljepoća. Unatoč tome, postoji mali broj odobrenih lijekova koji se uglavnom koriste za liječenje težih oblika bolesti, među kojima su najčešće korištene kapi za oko s ciklosporinom A. Ipak, njihov odgođeni nastup djelovanja može smanjiti adherenciju pacijenata. Kako bi se nadišao ovaj problem, topikalni glukokortikoidi propisuju se uz kapi za oko s ciklosporinom A u kratkotrajnom režimu doziranja, što, nažalost, predstavlja rizik za razvoj ozbiljnih nuspojava karakterističnih za glukokortikoide (povišeni očni tlak, katarakta i oportunističke infekcije). Topikalni NSAR mogli bi se kratkotrajno primjenjivati kao sigurnija zamjena za glukokortikoide. Kapi za oko s mucinskim sekretogom rebamipidom u obliku suspenzije (2 %, Mucosta[®]) odobrene su u Japanu za liječenje bolesti suhog oka, no unatoč dokazanoj učinkovitosti režim doziranja navedenog lijeka, koji se primjenjuje čak 4 puta dnevno, negativno utječe na adherenciju pacijenata.

Cilj ovog doktorskog rada je razvoj funkcionalne kationske nanoemulzije za liječenje bolesti suhog oka, specifično dizajnirane s obzirom na fizičko-kemijska svojstva koja određuju stabilnost formulacije i oslobađanje uklopljenih djelatnih tvari te biokompatibilnost i mukoadhezivnost formulacije. Kationska nanoemulzija, zbog svojih intrinzičnih svojstava, može osigurati uklanjanje simptoma bolesti suhog oka uz smanjenu učestalost doziranja, a uklopljenoj djelatnoj tvari može produžiti vrijeme zadržavanja na površini oka.

Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzije ključna su za njezin klinički učinak, stoga su specifični ciljevi rada optimizacija formulacijskih i procesnih parametara kako bi se pripravile kationske nanoemulzije:

- i. male veličine kapljica, malog PDI i pozitivnog zeta-potencijala
- ii. pH, viskoznosti, osmolarnosti i površinske napetosti prikladnih za oftalmičku primjenu
- iii. dobre učinkovitosti uklapanja odabranih djelatnih tvari
- iv. odgovarajuće stabilnosti tijekom pohrane te nakon sterilizacije autoklaviranjem i/ili filtracijom
- v. kontroliranog oslobađanja uklopljene djelatne tvari, prilagođenog vremenskom okviru kontakta s mjestom primjene
- vi. mukoadhezivnih svojstava
- vii. istaknute biokompatibilnosti.

Tijekom izrade doktorskog rada velika je pažnja posvećena odabiru vrste i udjela pomoćnih tvari kako bi se pripravile stabilne formulacije željenih fizičko-kemijskih i biofarmaceutskih svojstava, uz istodobno zadržavanje netoksičnosti te ugodnosti i jednostavnosti primjene.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

U pripravi nanoemulzija korištena su sljedeća ulja: nerafinirano ricinusovo ulje (Kemig, Zagreb, Hrvatska), Miglyol[®] 812 (Kemig), visokopročišćeno sezamovo ulje (Croda International Plc, Snaith, Ujedinjeno Kraljevstvo) i rafinirano sojino ulje (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Od površinski aktivnih tvari korišteni su: Kolliphor[®] EL (BASF, Ludwigshafen, Njemačka), Pluronic[®] F68 (Sigma-Aldrich), Tween[®] 60 (Kemig), Tween[®] 80 (Kemig) i lecitin (Lipoid S 45, Lipoid, Ludwigshafen, Njemačka). Kao nositelji pozitivnog naboja korišteni su stearilamin (Sigma-Aldrich), kitozan male molekulske mase (50-190 kDa, stupanj deacetilacije 75-85 %, viskoznost vodene otopine (1 %) u octenoj kiselini (1 %) 20-300 mPas, Sigma-Aldrich) te kitozan srednje molekulske mase (190-310 kDa, stupanj deacetilacije 75-85 %, viskoznost vodene otopine (1 %) u octenoj kiselini (1 %) 200-800 mPas, Sigma-Aldrich). Ibuprofen (Hubei Biocause Pharmaceutical Co., Ltd., Jingmen, Kina) je donirala PLIVA Hrvatska d.o.o. (Zagreb, Hrvatska), a rebamipid je kupljen od tvrtke Carbosynth Ltd. (Compton, Ujedinjeno Kraljevstvo). Kao sredstvo za izotonizaciju nanoemulzija korišten je glicerol (T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska). Mucin tipa II izoliran iz želuca svinje i fluorescein (natrijeva sol) kupljeni su od Sigmee-Aldrich, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-1-etansulfonska kiselina (HEPES) od AppliChema (Darmstadt, Njemačka), izopropanol od Kemiga, a Na₂HPO₄ × 2H₂O od Fluke Chemie AG (Buchs, Švicarska). Sve ostale tvari nabavljene su od Kemiga ili Sigmee-Aldrich. Simulirana suzna tekućina (engl. *simulated tear fluid*, STF) pH vrijednosti 7,4 pripravljena je otapanjem KCl (1,4 mg mL⁻¹), NaCl (6,8 mg mL⁻¹), NaHCO₃ (2,2 mg mL⁻¹) i CaCl₂ × 2H₂O (0,08 mg mL⁻¹) u pročišćenoj vodi (SG, Günzburg, Njemačka). Hankova uravnotežena otopina soli (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) pH vrijednosti 7,4 ili 6,0 pripravljena je kao vodena otopina KCl (0,4 mg mL⁻¹), NaHCO₃ (0,35 mg mL⁻¹), NaCl (8,0 mg mL⁻¹), D-glukoza monohidrata (1,1 mg mL⁻¹), KH₂PO₄ (0,06 mg mL⁻¹), Na₂HPO₄ × 2H₂O (0,06 mg mL⁻¹), CaCl₂ × 2H₂O (0,185 mg mL⁻¹), MgCl₂ × 6H₂O (0,1 mg mL⁻¹), MgSO₄ × 7H₂O (0,1 mg mL⁻¹) i HEPES-a (7,15 mg mL⁻¹). Krebs-Ringerov pufer (engl. *Krebs-Ringer buffer*, KRB) pH vrijednosti 7,4 pripremljen je otapanjem KCl (0,4 mg mL⁻¹), NaCl (6,8 mg mL⁻¹), NaHCO₃ (2,1 mg mL⁻¹), MgSO₄ × 7H₂O (0,4 mg mL⁻¹), D-glukoza monohidrata (1,1 mg mL⁻¹), CaCl₂ × 2H₂O (0,52 mg mL⁻¹), NaH₂PO₄ × 2H₂O (0,158 mg mL⁻¹) i HEPES-a (3,575 mg mL⁻¹) u pročišćenoj vodi.

3.2. METODE

3.2.1. Priprava nanoemulzija

3.2.1.1. Primarni probir ulja i površinski aktivnih tvari

S ciljem primarnog probira ulja i površinski aktivnih tvari nanoemulzije su pripravljene tako da je ulje (ricinusovo, Miglyol[®] 812, sezamovo ili sojino; 5 %, *m/m*) dodano u vodenu otopinu površinski aktivne tvari (Kolliphor[®] EL, Pluronic[®] F68, Tween[®] 60 ili Tween[®] 80; 0,5-5 %, *m/m*), uz magnetsko miješanje pri sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedila homogenizacija na visokoturažnoj miješalici (Ultra-Turrax[®], IKA-Werke GmbH & Company, Staufen, Njemačka) pri brzini okretaja 6000 rpm tijekom 5 minuta. Dobivena je gruba emulzija potom obrađena na mikrofluidizatoru (model M-110EH-30, Microfluidics[®], SAD) pri 1000 bara i 10 ciklusa.

3.2.1.2. Priprava primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom

Uklapanje stearylamina u nanoemulzije provedeno je tako da je stearylamin (0,01-0,3 %, *m/m*) najprije otopljen u Miglyol[®]-u 812 (5 %, *m/m*) uz zagrijavanje na 70 °C. U tako pripravljenu uljnu fazu dodana je vodena otopina Kolliphor[®]-a EL (2,5 %, *m/m*) i glicerola (2,5 %, *m/m*) zagrijana na jednaku temperaturu (vodena faza), uz magnetsko miješanje. Ostatak pripreve proveden je na prethodno opisan način (odjeljak 3.2.1.1.).

3.2.1.3. Priprava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

3.2.1.3.1. Probir udjela lecitina i Kolliphor[®]-a EL

Prvi korak u pripravi sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom bio je odabir negativno nabijene površinski aktivne tvari koja bi omogućila pripravu primarnih anionskih nanoemulzija. Sekundarna kationska nanoemulzija nastaje dodatkom otopine kitozana u primarnu anionsku nanoemulziju zbog elektrostatskih interakcija i oblaganja površine kapljica pozitivno nabijenim molekulama kitozana. Kao negativno nabijena površinski aktivna tvar odabran je lecitin te je ispitana njegova topljivost u ricinusovom ulju, Miglyol[®]-u 812, sezamovom i sojinom ulju. Kako je lecitin pri sobnoj temperaturi bilo moguće otopiti jedino u Miglyol[®]-u 812, Miglyol[®] 812 izabran je za daljnja ispitivanja. U svrhu probira udjela lecitina, lecitin (0,1-1,0 %, *m/m*) je otopljen u Miglyol[®]-u 812 (5 %, *m/m*) uz magnetsko miješanje pri sobnoj temperaturi. Tako pripravljena uljna faza dodana je u pročišćenu vodu (vodena faza) uz magnetsko miješanje, a ostatak je pripreve proveden kao što je prethodno opisano (odjeljak 3.2.1.1.). Kao sekundarna neionska površinski aktivna tvar korišten je Kolliphor[®] EL. Za probir udjela Kolliphor[®]-a EL

nanoemulzije su pripravljene na isti način, pri čemu je vodenu fazu tvorila vodena otopina Kolliphor[®]-a EL (0,25-2,5 %, *m/m*), a uljnu fazu otopina lecitina (0,1 %, *m/m*) u Miglyol[®]-u 812 (5 %, *m/m*).

3.2.1.3.2. Optimizacija procesnih parametara

Optimizacija procesnih parametara (tlaka i broja ciklusa) provedena je na gruboj emulziji optimiziranog sastava (Miglyol[®] 812 5 % (*m/m*), lecitin 0,1 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 0,5 % (*m/m*) i pročišćena voda do 100 % (*m/m*)). Primijenjeni tlak iznosio je 400-1300 bara, a broj ciklusa 1-15. Gruba emulzija istog sastava obrađena je i na visokotlačnom homogenizatoru (Panda Plus 2000[®], GEA Niro Soavi, Parma, Italija) pri 1000 bara i 5 ciklusa.

3.2.1.3.3. Probir tipa i udjela kitozana te metode za pripravu sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

U pripravi sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom korištene su dvije različite metode. Kitozan (1 %, *m/m*) male ili srednje molekulske mase otopljen je u pročišćenoj vodi s 0,5 % (*m/m*) octene kiseline miješanjem na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi, a zatim je tako pripravljena otopina filtrirana. U prvoj je metodi otopina kitozana (1 %, *m/m*) izravno dodana u prethodno pripravljenu nanoemulziju (mikrofluidizator; 1000 bara, 5 ciklusa) optimiziranog sastava (Miglyol[®] 812 5 % (*m/m*), lecitin 0,1 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 0,5 % (*m/m*) i pročišćena voda do 100 % (*m/m*)). Konačni udio kitozana u nanoemulzijama iznosio je 0,05-0,5 % (*m/m*). Udio Miglyol[®]-a 812 u svim je formulacijama prilagođen na 2,5 % (*m/m*) dodatkom pročišćene vode, ako je bilo potrebno. U drugoj metodi korišten je samo kitozan male molekulske mase. Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom pripravljene su tako da je otopina kitozana (1 %, *m/m*) dodana u vodenu fazu (otopinu Kolliphor[®]-a EL u pročišćenoj vodi) na samom početku pripreve, prije primješavanja uljne faze i obrade na visokoturažnoj miješalici (6000 rpm, 5 minuta) te mikrofluidizatoru (1000 bara, 5 ciklusa). Konačni udio kitozana iznosio je 0,05 i 0,3 % (*m/m*), dok je udio Miglyol[®]-a 812 ponovno prilagođen na 2,5 % (*m/m*) dodatkom pročišćene vode.

3.2.2. Ispitivanje topljivosti ibuprofena

Topljivost ibuprofena ispitana je u Miglyolu[®] 812 i otopini lecitina u Miglyolu[®] 812 (1:50, *m/m*) pri sobnoj temperaturi, tako da je ibuprofen, u količini koja prelazi njegovu topljivost, dodan na 5 g ulja odnosno otopine lecitina u ulju. Suspenzija je ostavljena na magnetskoj miješalici tijekom 48 sati kako bi se uspostavila ravnoteža, a potom je centrifugirana 30 minuta pri 1520 × g.

Supernatant je filtriran kroz Spartan™ filter (Whatman, Ujedinjeno Kraljevstvo) od regenerirane celuloze, veličine pora 0,2 μm te je razrijeđen metanolom. Sadržaj ibuprofena određen je pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC), kao što je opisano u odjeljku 3.2.9.

3.2.3. Uklapanje ibuprofena u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom

Ibuprofen (0,2 %, *m/m*) je uklopljen u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom male molekulske mase (0,05 i 0,3 %, *m/m*) pripravljene drugom metodom, tako da je prije miješanja faza otopljen u uljnoj fazi (otopini lecitina u Miglyol®-u 812), uz magnetsko miješanje pri sobnoj temperaturi. Glicerol (2,5 %, *m/m*) je dodan u vodenu fazu kao sredstvo za izotonizaciju. Kontrolna formulacija pripravljena je na isti način, ali bez dodatka kitozana u vodenu fazu.

3.2.4. Ispitivanje topljivosti rebamipida

Topljivost rebamipida ispitana je u ricinusovom ulju, Miglyolu® 812, sezamovom i sojinom ulju pri sobnoj temperaturi, dodatkom rebamipida, u količini koja prelazi njegovu topljivost, na 5 g ulja. Suspenzije su ostavljene na magnetskoj miješalici tijekom 48 sati kako bi se uspostavila ravnoteža, a potom su centrifugirane. Suspenzija rebamipida u Miglyolu® 812 centrifugirana je 30 minuta pri 1520 × g, a zatim je filtrirana (Spartan™ filter, regenerirana celuloza, 0,2 μm). Nakon što su suspenzije rebamipida u ricinusovom, sojinom i sezamovom ulju centrifugirane 30 minuta pri 1520 × g, supernatanti su bili zamućeni, a nije ih bilo moguće filtrirati zbog prevelike viskoznosti ulja. Iz tog su razloga navedene suspenzije centrifugirane 30 minuta pri 5700 × g, nakon čega su dobiveni bistri supernatanti. Supernatanti su zatim razrijeđeni metanolom (ricinusovo ulje i Miglyol® 812) odnosno izopropanolom (sezamovo i sojino ulje), a sadržaj rebamipida određen je UPLC metodom opisanom u odjeljku 3.2.10.

3.2.5. Fizičko-kemijska karakterizacija nanoemulzija

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

Veličina kapljica i indeks polidisperznosti (PDI) nanoemulzija izmjereni su dinamičkim raspršivanjem svjetlosti, a zeta-potencijal elektroforetskim raspršivanjem svjetlosti pomoću uređaja Zetasizer Nano Series ili Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) pri 25 °C. Kut detekcije kod mjerenja veličine kapljica i PDI iznosio je 175 odnosno 90°. Kako bi se izbjegao učinak višestrukog raspršivanja svjetlosti na rezultate mjerenja veličine kapljica i PDI, ispitana su različita razrjeđenja nanoemulzija (100-2000 ×, *V/V*)

u filtriranoj (0,45 μm) pročišćenoj vodi. Kod prekoncentriranog uzorka svjetlost raspršena s jedne kapljice na putu do detektora nailazi na druge kapljice s kojih se također raspršuje te joj se smanjuje intenzitet. U tom je slučaju izmjerena veličina kapljica manja od stvarne veličine. S druge strane, kod prevelikog razrjeđenja uzorka intenzitet raspršene svjetlosti nije dovoljan za analizu (89). Razlike u izmjerenoj veličini kapljica i PDI pri različitim razrjeđenjima bile su zanemarive, što ukazuje na stabilnost pripremljenih nanoemulzija nakon razrjeđenja vodom, stoga su u konačnici nanoemulzije prije mjerenja razrijeđene $100\text{-}500 \times (V/V)$. Prije mjerenja zeta-potencijala nanoemulzije su razrijeđene filtriranom (0,45 μm) 10 mM vodenom otopinom NaCl $100 \times (V/V)$. Za mjerenje zeta-potencijala korištene su jednokratne kivete DTS1070 (Malvern Instruments).

3.2.5.2. Mjerenje pH, osmolarnosti, viskoznosti i površinske napetosti

pH vrijednost nanoemulzija izmjerena je pri 25 °C pomoću uređaja Seven Multi pH/conductometer (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD). Osmolarnost nanoemulzija izmjerena je na uređaju Advanced[®] 3D3 Single-Sample Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA, SAD) metodom sniženja temperature leđišta. Viskoznost nanoemulzija (i čistih ulja korištenih u pripravi nanoemulzija) određena je pri 25 °C rotacijskim testom pri kontroliranoj brzini smicanja korištenjem MCR 102 reometra (Anton Paar, Graz, Austrija), uz mjerno tijelo stožac-ploča (engl. *cone-plate*) CP 50-1 promjera 50 mm i nagiba 1°, pri čemu je razmak između gornjeg i donjeg mjernog tijela iznosio 0,102 mm. Primijenjena brzina smicanja bila je 1-100 s⁻¹. Površinska napetost nanoemulzija izmjerena je pri 25 °C na tenziometru Krüs K-100C (Hamburg, Njemačka) Do Noüy metodom s prstenom. Cirkulirajuća vodena kupelj spojena je na tenziometar radi održavanja konstantne temperature tijekom mjerenja.

3.2.5.3. Morfološka karakterizacija nanoemulzija

Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozonom (i kontrolna nanoemulzija bez kitozana) dodatno su okarakterizirane metodom mikroskopije atomskih sila (AFM) kako bi se utvrdila njihova morfologija i potvrdili rezultati dobiveni metodom dinamičkog raspršivanja svjetlosti. Za AFM analizu korišten je uređaj AutoProbe CP-Research SPM (TM Microscopes-Bruker, Karlsruhe, Njemačka), uz pretražnik površine duljine 90 μm . Prije analize nanoemulzije su razrijeđene ultračistom vodom $500 \times (V/V)$, a zatim je 10 μL razrijeđenog uzorka stavljeno na kružni mika supstrat (Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, CA, SAD) i osušeno u vakuumu. Zbog prirode uzorka primijenjen je beskontaktni način rada. Sva mjerenja provedena su u zraku korištenjem beskontaktna sonde (Bruker Phosphorous doped silicon

Tap300, model MPP-11123-10) obložene prevlakom od aluminija i simetričnim nastavkom. Pogonska frekvencija konzole iznosila je oko 300 kHz. Snimljene slike analizirane su pomoću programa Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT, Moskva, Rusija).

3.2.5.4. Ispitivanje učinkovitosti uklapanja ibuprofena

Učinkovitost uklapanja (engl. *entrapment efficiency*, EE) ibuprofena unutar uljnih kapljica nanoemulzije određena je separacijskom metodom ultrafiltracije. 2 mL nanoemulzije stavljeno je u gornji odjeljak kivete za centrifugiranje s uklopljenim filterom (Centricon[®], NMWL 10 kDa, Merck Millipore, Burlington, MA, SAD). Centrifugiranje je provedeno pri $5000 \times g$ tijekom 1 sata, nakon čega je UPLC metodom (odjeljak 3.2.9.) analiziran sadržaj ibuprofena u vodenoj fazi nanoemulzije, koja je prošla kroz filter u donji odjeljak kivete. EE (%) izračunata je prema jednadžbi:

$$EE \% = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100$$

gdje W_t označava ukupni sadržaj ibuprofena u nanoemulziji, a W_f sadržaj ibuprofena u filtratu (vodenoj fazi nanoemulzije).

3.2.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

Stabilnost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom ispitana je nakon 30 i 150 dana pohrane pri 4 °C mjerenjem veličine kapljica, PDI, zeta-potencijala i pH.

Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom ispitana je nakon 30 dana pohrane pri 4 i 25 °C mjerenjem veličine kapljica, PDI, zeta-potencijala i pH te posebnim stres testovima (ciklusi zagrijavanja i hlađenja, centrifugiranje, ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja), kao što je prethodno opisano u literaturi (113). 6 ciklusa zagrijavanja (45 °C) i hlađenja (4 °C) provedeno je pohranom nanoemulzija pri navedenim temperaturama najmanje 48 sati. Centrifugiranje nanoemulzija provedeno je pri $9000 \times g$ tijekom 30 minuta. 3 ciklusa zamrzavanja (-20 °C) i odmrzavanja (25 °C) provedena su pohranom nanoemulzija pri navedenim temperaturama najmanje 48 sati. Za svaki od navedenih stres testova korištene su svježe pripravljene nanoemulzije, a njihova je stabilnost određena mjerenjem veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala te vizualnim pregledom nakon svakog ciklusa, odnosno centrifugiranja.

3.2.7. Sterilizacija nanoemulzija

U svrhu sterilizacije nanoemulzije su aseptički filtrirane kroz filtere od polietersulfona (veličine pora 0,2 μm) ili sterilizirane zasićenom vodenom parom pod tlakom (autoklavirane) 20 minuta pri 121 °C. Nakon oba sterilizacijska postupka nanoemulzije su pregledane vizualno te im je izmjerena veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal.

3.2.8. Ispitivanje *in vitro* oslobađanja ibuprofena

In vitro oslobađanje ibuprofena iz sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom ispitano je pri 34 °C korištenjem farmakopejske aparature s rotirajućom lopaticom (708-DS Dissolution Apparatus, Agilent Technologies, Santa Clara, SA, SAD). 1 mL nanoemulzije stavljen je u dijalizacijsku vrećicu od celuloze (Spectra/Por1 4 Dialysis Tubing, MWCO 12-14 kDa, Medicell International Ltd, London, Ujedinjeno Kraljevstvo) koja je pričvršćena za lopaticu, a zatim uronjena u 900 mL fosfatnog pufera pH 7,4. Brzina okretaja lopatice iznosila je 50 rpm. Uzorci (2 mL) su uzimani tijekom 6 sati u određenim vremenskim intervalima, a nakon svakog uzorkovanja u posudu za oslobađanje dodano je po 2 mL svježeg fosfatnog pufera pH 7,4 kako bi volumen medija za oslobađanje ostao nepromijenjen tijekom eksperimenta. Na kraju eksperimenta uzorkovan je i sadržaj iz dijalizacijske vrećice. Nanoemulzija bez kitozana s uklopljenim ibuprofenom (0,2 %, *m/m*), otopina ibuprofena (0,2 %, *m/m*) u Miglyol[®]-u 812 i komercijalno dostupna oralna suspenzija ibuprofena (Neofen[®], Belupo, Koprivnica, Hrvatska) razrijeđena pročišćenom vodom do 0,2 % (*m/m*) ibuprofena korištene su kao kontrola. Sadržaj ibuprofena u uzorcima određen je UPLC metodom (odjeljak 3.2.9.). Oslobađanje ibuprofena *in vitro* iz pojedine formulacije ispitano je najmanje u triplicatu.

3.2.9. Određivanje sadržaja ibuprofena

Određivanje sadržaja ibuprofena provedeno je na UPLC uređaju Agilent Infinity 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) opremljenom kolonom Acquity UPLC[®] BEH Shield RP18 (Waters, Milford, MA, SAD) dimenzija 1,7 μm , 2,1 mm \times 50 mm, primjenom izokratne metode. Kod ispitivanja topljivosti ibuprofena u Miglyol[®]-u 812 i otopini lecitina u Miglyol[®]-u 812 mobilna faza sastojala se od fosfatnog pufera (NaH_2PO_4 1,2 mg mL⁻¹, pH 2,5) i acetonitrila (ACN, Merck Millipore) u omjeru 60:40 (V/V). Temperatura kolone iznosila je 50 °C, brzina protoka mobilne faze kroz kolonu 0,4 mL min⁻¹, volumen injektiranja 4 μL , a valna duljina detekcije 225 nm. U svrhu ispitivanja učinkovitosti uklapanja ibuprofena uzorci (filtrati) su analizirani bez prethodnog razrijeđivanja. Mobilna faza sastojala se od fosfatnog

pufera i ACN-a (65:35, V/V), temperatura kolone iznosila je 50 °C, brzina protoka mobilne faze kroz kolonu 0,8 mL min⁻¹, volumen injektiranja 4 µL, a valna duljina detekcije 225 nm. Kod ispitivanja sadržaja ibuprofena u uzorcima uzorkovanim za vrijeme oslobađanja ibuprofena *in vitro* korištene su dvije različite metode, ovisno o tome jesu li analizirani uzorci iz receptorskog ili donorskog odjeljka (dijalizacijske vrećice). Uzorci iz receptorskog odjeljka analizirani su bez prethodnog razrjeđivanja. Mobilna se faza sastojala od fosfatnog pufera i ACN-a (65:35, V/V), temperatura kolone iznosila je 50 °C, brzina protoka mobilne faze kroz kolonu 0,8 mL min⁻¹, volumen injektiranja 20 µL, a valna duljina detekcije 225 nm. Uzorci uzeti iz donorskog odjeljka razrijeđeni su metanolom te su analizirani metodom korištenom za ispitivanje topljivosti ibuprofena u Miglyol[®]-u 812 i otopini lecitina u Miglyol[®]-u 812. Svi su uzorci i standardne otopine prije analize filtrirani kroz Spartan[™] filtere od regenerirane celuloze, veličine pora 0,2 µm. Kod analize pojedine sekvence standardne otopine pripravljene u duplikatu injektirane su naizmjenično, tako da je provedeno najmanje 5 injektiranja standardnih otopina u svakoj sekvenci. Prikladnost metoda ispitana je i dokazana prema sljedećim kriterijima: relativna standardna devijacija (RSD) odgovora detektora nije bila veća od 2,0 %, a faktor razvlačenja pikova (engl. *tailing factor*) nije bio veći od 1,5. Validacija metoda provedena je ispitivanjem linearnosti, točnosti i ponovljivosti. Navedene metode pokazale su se linearnima ($R^2 \geq 0,99$), točnima (analitički prinos (engl. *recovery*) 98-102 %) i ponovljivima (RSD površine pika $\leq 2,0$ %).

3.2.10. Određivanje sadržaja rebamipida

Određivanje sadržaja rebamipida provedeno je na UPLC uređaju Acquity UPLC[®] H-Class (Waters), opremljenom kolonom Acquity UPLC BEH[®] Shield RP18 (Waters) dimenzija 1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm, primjenom izokratne metode. Mobilna faza sastojala se od fosfatnog pufera (NaH₂PO₄ 1,2 mg mL⁻¹, pH 2,5) i acetonitrila (ACN, Merck Millipore) u omjeru 60:40 (V/V). Temperatura kolone iznosila je 55 °C, brzina protoka mobilne faze kroz kolonu 0,4 mL min⁻¹, volumen injektiranja 2 µL, a valna duljina detekcije 229 nm. Svi su uzorci i standardne otopine prije analize filtrirani kroz Spartan[™] filtere od regenerirane celuloze, veličine pora 0,2 µm. Prikladnost metode ispitana je i dokazana prema sljedećim kriterijima: relativna standardna devijacija (RSD) odgovora detektora nije bila veća od 2,0 %, a faktor razvlačenja pikova (engl. *tailing factor*) nije bio veći od 1,5. Validacija metode provedena je ispitivanjem linearnosti, točnosti i ponovljivosti, pri čemu se metoda pokazala linearnom ($R^2 \geq 0,99$), točnom (analitički prinos (engl. *recovery*) 98-102 %) i ponovljivom (RSD površine pika $\leq 2,0$ %).

3.2.11. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija

3.2.11.1. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija reološkom metodom

Mukoadhezivna svojstva primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom i sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom ispitana su prethodno opisanom reološkom metodom (109), uz određene promjene u metodi kako bi primijenjeni uvjeti bolje simulirali biofarmaceutska zbivanja na površini oka. Ispitivanja su provedena rotacijskim testom pri kontroliranoj brzini smicanja korištenjem reometra MCR 102, uz mjerno tijelo stožac-ploča (engl. *cone-plate*) CP 50-1 promjera 50 mm i nagiba 1°, pri čemu je razmak između gornjeg i donjeg mjernog tijela iznosio 0,102 mm. Disperzija mucina (20 %, *m/m*) u STF-u pripravljena je miješanjem na magnetskoj miješalici tijekom noći pri sobnoj temperaturi. Nanoemulzije su pomiješane s disperzijom mucina (20 %, *m/m*) u omjeru 1:1 (*m/m*) te su miješane na magnetskoj miješalici (750 rpm) tijekom 15 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom su ostavljene u mirovanju tijekom 1 sata, neposredno prije mjerenja. Na isti način pripravljena je 10 %-tna (*m/m*) disperzija mucina (dodatkom pročišćene vode u disperziju mucina (20 %, *m/m*) u omjeru 1:1 (*m/m*)) i disperzija nanoemulzija u STF-u (dodatkom STF-a u nanoemulziju u omjeru 1:1 (*m/m*)). Krivulje viskoznosti tako pripremljenih uzoraka dobivene su pri brzini smicanja 1-100 s⁻¹ pri 34 °C. Za izračun komponente viskoznosti zbog bioadhezije (η_b) uzete su vrijednosti viskoznosti izmjerene pri 100 s⁻¹ te je η_b izračunata prema jednadžbi:

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

gdje η_{n+m} označava viskoznost nanoemulzije pomiješane s disperzijom mucina, η_m viskoznost disperzije mucina (10 %, *m/m*), a η_n viskoznost nanoemulzije pomiješane sa STF-om. Sva mjerenja provedena su u triplikatu.

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

Mukoadhezivna svojstva primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom ispitana su prethodno opisanom metodom, kod koje su interakcije nanosustava i mukusa životinjskog porijekla promatrane mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala nanosustava nakon miješanja i inkubacije s razrijeđenim mukusom (114). Uvjeti navedene metode prilagođeni su kako bi bolje simulirali biofarmaceutska zbivanja na površini oka. Ukratko, disperzija mucina (1 %, *m/m*) u STF-u pripravljena je miješanjem na magnetskoj miješalici preko noći pri sobnoj temperaturi. Nanoemulzije su pomiješane s disperzijom mucina (1 %, *m/m*) u omjeru 40:7 (*V/V*)

i ostavljene na magnetskoj miješalici (300 rpm) tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Uzorci su uzeti u 5. i 20. minuti te im je izmjerena veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal na prethodno opisan način (odjeljak 3.2.5.1.), uz razrjeđenje prije mjerenja veličine kapljica $100 \times (V/V)$.

3.2.12. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija

3.2.12.1. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija *in vitro*

U *in vitro* ispitivanju biokompatibilnosti nanoemulzija korištena je HCE-T stanična linija imortaliziranih epitelnih stanica rožnice humanog porijekla (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan). Ispitivanja su provedena na monosloju (2D HCE-T model) i na višesloju stanica (3D HCE-T model).

3.2.12.1.1. Uvjeti uzgoja stanica

Za uzgoj stanica korišten je hranidbeni medij DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich) obogaćen dodatkom fetalnog goveđeg seruma (5 %, V/V, Biosera, Boussens, Francuska), inzulina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich), dimetilsulfoksida (0,5 %, V/V, AppliChem), epidermalnog faktora rasta (10 ng mL^{-1} , Sigma-Aldrich) i otopine penicilina, streptomicina i amfotericina B (1 %, V/V, kataloški broj 17-745E, Lonza, Basel, Švicarska). Stanice su uzgajane u vlažnoj atmosferi s 5 % CO_2 pri 37°C . Hranidbeni medij mijenjan je svaki drugi dan, a stanice su odjeljivane od podloge pomoću tripsina (0,25 %, V/V, Lonza) i presađivane kada bi postigle 80-90 % konfluentnosti.

3.2.12.1.2. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija na 2D HCE-T modelu

Za uzgoj 2D HCE-T modela suspenzija stanica u obogaćenom hranidbenom mediju nasadena je na ploču s 96 jažica (10^4 stanica po jažici). Nakon postizanja konfluentnosti medij je uklonjen, a stanice su isprane HBSS puferom pH 7,4 (približno $100 \mu\text{L}$ po jažici). Nakon uklanjanja pufera u jažice je dodano po $100 \mu\text{L}$ nanoemulzija razrijeđenih u HBSS puferu pH 7,4 $10 \times (V/V)$, kao što je prethodno opisano (115). Stanice su zatim inkubirane 30 minuta pri 37°C , nakon čega je slijedilo uklanjanje nanoemulzija iz jažica i ponovno ispiranje stanica HBSS puferom pH 7,4. Nakon uklanjanja pufera stanice su vraćene u medij ($100 \mu\text{L}$ po jažici) i ostavljene u inkubatoru (vlažna atmosfera, 5 % CO_2 , 37°C) do sljedećeg dana, kada je proveden MTT test radi utvrđivanja vijabilnosti stanica. Po $20 \mu\text{L}$ otopine MTT-a ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$) u fosfatno puferiranoj otopini soli pH 7,4 (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, Lonza) dodano je u svaku jažicu te su stanice inkubirane tijekom 3 sata pri 37°C . Otopina je nakon toga

uklonjena, a nastali kristali formazana otopljeni su dodatkom izopropanola (100 μ L po jažici). Apsorbancija otopine formazana u izopropanolu izmjerena je pri 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (1420 Multilabel counter VICTOR³, Perkin Elmer, Waltham, MA, SAD). Stanice inkubirane u HBSS puferu pH 7,4 korištene su kao negativna kontrola. Sva ispitivanja provedena su u pentaplikatu.

3.2.12.1.3. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija na 3D HCE-T modelu

Uzgoj 3D HCE-T modela proveden je na prethodno opisan način (101). Za uzgoj modela korištene su Transwell[®] ploče s 12 jažica, s polikarbonatnom membranom veličine pora 0,4 μ m, promjera 12 mm i površine 1,12 cm² (Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Nizozemska). Prije nasađivanja stanica membrane ploče obložene su kolagenom tipa I iz repa štakora (225 μ g po jažici, Sigma-Aldrich) i humanim fibronektinom (4 μ g po jažici, Sigma-Aldrich). Suspenzija stanica u obogaćenom hranidbenom mediju nasađena je na obloženu membranu ploče (10⁵ stanica po jažici), pri čemu je volumen donorskog i receptorskog odjeljka iznosio 0,5 i 1,5 mL. Stanice su tako uzgajane tijekom 4-7 dana (medij je mijenjan svaki drugi dan), odnosno do naglog porasta u transepitelnom električnom otporu (engl. *transepithelial electrical resistance*, TEER), koji je praćen pomoću uređaja Millicell ERS-2 Voltohmmeter i STX01 elektrode (Merck Millipore). Nakon naglog porasta TEER vrijednosti stanice su izložene zraku, tako da je uklonjen medij iz donorskog odjeljka, a volumen medija u receptorskom odjeljku povećan je na 2 mL umetanjem metalne ploče između Transwell[®] umetaka s konfluentnim monoslojem stanica i ploče. Nakon izlaganja zraku stanice su uzgajane još 3 dana, pri čemu je medij u receptorskom odjeljku mijenjan svaki dan. Izlaganjem stanica zraku potiče se diferencijacija stanica i stvaranje višeslojnog epitela, što simulira epitel rožnice *in vivo* (99, 100). Prije samog ispitivanja biokompatibilnosti nanoemulzija uklonjen je medij iz receptorskog odjeljka, a stanice su isprane HBSS puferom. U ispitivanju biokompatibilnosti primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom pH pufera iznosio je 7,4, dok je u ispitivanju biokompatibilnosti sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom pH pufera iznosio 6,0 radi zadržavanja protoniranog oblika kitozana. Nakon uklanjanja pufera Transwell[®] umeci s višeslojem stanica prebačeni su na novu ploču s 12 jažica (Corning B.V. Life Sciences) te su inkubirani u HBSS puferu tijekom 30 minuta pri 37 °C, pri čemu je volumen donorskog i receptorskog odjeljka iznosio 0,5 i 1,5 mL. Nakon inkubacije uklonjen je pufer iz donorskih odjeljaka te je na njegovo mjesto dodano po 0,5 mL nanoemulzija razrijeđenih 10 \times (V/V) u HBSS puferu (115). Stanice su zatim inkubirane tijekom 30 minuta pri 37 °C, a zatim su nanoemulzije uklonjene iz donorskih odjeljaka. Stanice su nakon toga isprane HBSS puferom,

a nakon uklanjanja pufera iz donorskog i receptorskog odjeljka Transwell® umeci s višeslojem stanica prebačeni su na novu ploču s 12 jažica, s metalnom pločom i 2 mL medija u receptorskom odjeljku te su izložene zraku stanice ostavljene u inkubatoru (vlažna atmosfera, 5 % CO₂, 37 °C) do sljedećeg dana, kada je proveden MTT test radi utvrđivanja vijabilnosti. MTT test proveden je prema prethodno opisanom protokolu (116). Ukratko, uklonjen je medij iz donorskog i receptorskog odjeljka te je u oba odjeljka dodano po 0,7 mL otopine MTT-a (0,5 mg mL⁻¹) u obogaćenom hranidbenom mediju. Stanice su zatim inkubirane tijekom 3 sata pri 37 °C, a potom je otopina MTT-a uklonjena iz oba odjeljka. Nastali kristali formazana otopljeni su dodatkom izopropanola (po 0,7 mL) u oba odjeljka. Po 0,1 mL otopine formazana u izopropanolu pipetiran je na ploču s 96 jažica, a zatim je izmjerena apsorbancija pri 570 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (1420 Multilabel counter VICTOR³). Stanice inkubirane u HBSS puferu (pH 7,4 ili 6,0) korištene su kao negativna kontrola, a kao dodatna kontrola kod ispitivanja biokompatibilnosti sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom korištena je suspenzija ibuprofena (0,2 mg mL⁻¹) u HBSS puferu pH 6,0. Sva su ispitivanja provedena u triplikatu.

3.2.12.2. Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija *ex vivo*

Ispitivanje biokompatibilnosti nanoemulzija *ex vivo* provedeno je na izoliranim rožnicama svinje. Svježe očne jabučice svinje (velike bijele svinje muškog i ženskog spola, 6-7 mjeseci stare, težine 90-115 kg) dobivene su iz lokalne klaonice. Očne jabučice su isprane fiziološkom otopinom (B. Braun, Melsungen, Njemačka) te su za vrijeme prijenosa do laboratorija čuvane u ohlađenom KRB puferu, u spremniku s ledom. Očne jabučice su zatim uronjene u Betadine® otopinu (1 %, Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija) te su tako ostavljene tijekom 3-5 minuta radi mikrobiološke dekontaminacije, a potom su isprane u PBS-u pH 7,4 koji je sadržavao 1 % (V/V) otopine penicilina, streptomicina i amfotericina B (kataloški broj 17-745E, Lonza). Ekscizija rožnica napravljena je u zaštitnom mikrobiološkom kabinetu (Thermo-Scientific, Waltham, MA, SAD), u roku od najviše 2 sata nakon smrti životinje. Izolirane rožnice s dijelom bjeloočnice postavljene su na čepove sterilnih plastičnih kiveta od 15 mL (Falcon™, Corning B.V. Life Sciences) napunjene PBS-om, tako da je epitelna strana rožnica bila okrenuta prema dolje. Na endotelnu stranu rožnica dodan je po 1 mL hranidbenog medija DMEM/F-12 bez dodataka (Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, SAD) s 4 % (m/V) agara (Muller Hinton II Agar, BBL™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, SAD), koji je prethodno autoklaviran (20 minuta/121 °C) i, prema potrebi, zagrijan do tekuće konzistencije korištenjem mikrovalne pećnice. Nakon ohlađenja medij s dodatkom agara poprimio je konzistenciju gela,

što je omogućilo zadržavanje prirodno zakrivljenog oblika rožnica. Rožnice su zatim prebačene na ploču sa 6 jažica (Corning B.V. Life Sciences), tako da je epitelna strana rožnica bila okrenuta prema gore. U svaku je jažicu dodano po 3,5 mL DMEM/F-12 hranidbenog medija obogaćenog dodatkom fetalnog goveđeg seruma (10 %, V/V) i otopine penicilina, streptomocina i amfotericina B (10 %, V/V), tako da su rožnice bile izložene zraku. Rožnice su zatim ostavljene u inkubatoru (vlažna atmosfera, 5 % CO₂, 37 °C) tijekom noći, a sljedećeg je dana provedeno ispitivanje biokompatibilnosti. Nakon uklanjanja medija na svaku je rožnicu postavljen silikonski prsten izrađen po mjeri. 0,2 mL nerazrijeđene nanoemulzije dodano je unutar prstena, a zatim je uslijedila inkubacija rožnica tijekom 5 i 15 minuta pri 37 °C. Nakon navedenih vremena inkubacije nanoemulzije i prsteni su uklonjeni, a rožnice su isprane PBS-om. Oštećenja rožnica ispitana su vizualno, bojenjem otopinom fluoresceina u PBS-u (2 mg mL⁻¹), uz kobaltno plavu lampu (Conóptica, Barcelona, Španjolska) radi povećanja intenziteta fluorescencije. Silikonski prsteni ponovno su stavljeni na rožnice te je unutar prstena dodano po 0,2 mL otopine fluoresceina. Nakon 20 sekundi otopina je uklonjena te su rožnice isprane PBS-om. Fotografije rožnica snimljene su u mraku, kroz žuti filter kobaltno plave lampe. Kao negativna kontrola korišten je PBS, a kao pozitivna kontrola korišteni su aceton (Sigma-Aldrich), 0,1 M vodena otopina NaOH i otopina benzalkonijevog klorida (BAK) u PBS-u (0,025 %, m/V). Kao dodatna kontrola korištena je suspenzija ibuprofena u PBS-u (2 mg mL⁻¹). Sva ispitivanja provedena su u triplikatu.

3.2.13. Statistička analiza

Statistička analiza provedena je na rezultatima ispitivanja mukoadezije i biokompatibilnosti *in vitro* sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom pomoću *One-way* ANOVA testa te Turkey odnosno Dunnett *post hoc* testa višestrukog uspoređivanja. Postavljena je granica statističke značajnosti $P < 0,05$, a analiza je provedena korištenjem programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD). Krivulje oslobađanja ibuprofena *in vitro* međusobno su uspoređene pomoću faktora sličnosti (engl. *similarity factor*, f_2), kao što je prethodno opisano (117). f_2 izračunat je prema jednadžbi:

$$f_2 = 50 \times \log_{10} \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}{n}}} \right]$$

gdje je n jednak broju vremenskih točaka, R_t udjelu oslobođenog ibuprofena u vremenu t za referentni (kontrolni) uzorak, a T_t udjelu oslobođenog ibuprofena u vremenu t za ispitivani uzorak. Krivulje oslobađanja smatrane su sličnima u slučaju $f_2 > 50$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tehnologija nanoemulzija ima rastući utjecaj na dostavu djelatnih tvari (40, 61), što se posebno ističe u oftalmičkoj primjeni (17, 44). Ipak, izražena osjetljivost površine oka uvelike sužava izbor pomoćnih tvari koje se u pripravi nanoemulzija mogu koristiti (118). Pažljivim odabirom pomoćnih tvari, njihove kombinacije i konačnog udjela, uz primjenu odgovarajućih procesnih parametara, moguće je pripremiti nanoemulziju takvih fizičko-kemijskih svojstava koja omogućuju produljeno zadržavanje formulacije na površini oka, kontroliranu dostavu uklopljene djelatne tvari i stabilizaciju suznog filma, uz istodobnu stabilnost formulacije i ugodnost primjene.

4.1. RAZVOJ PRIMARNIH KATIONSКИH NANOEMULZIJA SA STEARILAMINOM

4.1.1. Primarni probir ulja i neionskih površinski aktivnih tvari

Prvi korak u pripravi primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom bio je probir ulja i površinski aktivnih tvari, s ciljem pripreme monodisperzne formulacije male veličine kapljica. U pripravi nanoemulzija korištena su 4 različita ulja prikladna za oftalmičku primjenu: ricinusovo ulje, Miglyol[®] 812 (trigliceridi srednje duljine lanaca), sezamovo i sojino ulje te 4 različite neionske površinski aktivne tvari: Kolliphor[®] EL, Pluronic[®] F68, Tween[®] 60 i Tween[®] 80. Udio ulja iznosio je 5 % (*m/m*), a površinski aktivne tvari korištene su u rasponu udjela 0,5-5 % (*m/m*). Neionske površinski aktivne tvari najčešće su korištena skupina površinski aktivnih tvari u pripravcima za oftalmičku primjenu zbog manje toksičnosti i iritacijskog potencijala u odnosu na anionske i kationske površinski aktivne tvari. Također, pH vodenih otopina neionskih površinski aktivnih tvari nalazi se unutar fiziološkog raspona pH suznog filma (118). Površinski aktivne tvari korištene u pripravi nanoemulzija spadaju u višestruko etoksilirane neionske površinski aktivne tvari, a razlikuju se po strukturi, molekularnoj masi, kritičnoj micelizacijskoj koncentraciji te omjeru hidrofilnih i lipofilnih skupina (engl. *hydrophile-lipophile balance*), odnosno HLB vrijednosti (118). Tween[®] 60 (polioksietilen-20-sorbitanmonostearat) i Tween[®] 80 (polioksietilen-20-sorbitanmonooleat) su parcijalni esteri masnih kiselina i polioksietilensorbitana (polisorbati) te su strukturno veoma slični. Kolliphor[®] EL (polioksietilen-35-ricinoleat) je ester polioksietilena i ricinoleinske kiseline, a Pluronic[®] F68 je triblok kopolimer polioksietilena i polioksipropilena. Molekularna masa korištenih površinski aktivnih tvari dovoljno je velika za steričku stabilizaciju pripremljenih nanoemulzija (61). Od korištenih površinski aktivnih tvari Tween[®] 60 i Tween[®] 80 najmanjih su molekularnih masa (1312 i 1310 g mol⁻¹), stoga bi pripremljenim nanoemulzijama mogli osigurati

najslabiju steričku stabilizaciju. Molekulska masa Kolliphor[®]-a EL iznosi 2560 g mol⁻¹, a Pluronic[®]-a F68 čak 7680-9510 g mol⁻¹ (118, 119). Ipak, molekulska masa utječe i na kinetiku adsorpcije površinski aktivnih tvari na površinu novonastalih uljnih kapljica tijekom pripreve nanoemulzija te se adsorpcija događa brže kod površinski aktivnih tvari manje molekulske mase, što dovodi do nastajanja kapljica manje veličine (40). Kritična micelizacijska koncentracija utječe na stvaranje micela koje mogu biti prisutne u vanjskoj fazi nanoemulzije, što utječe na raspodjelu djelatne tvari u formulaciji (43), ali i na stabilnost same formulacije jer micelle prisutne u vanjskoj fazi mogu ubrzati rast kapljica mehanizmom Ostwaldovog zrenja (68). Među korištenim površinski aktivnim tvarima Tween[®] 80 i Tween[®] 60 imaju najmanju kritičnu micelizacijsku koncentraciju (0,0014 i 0,0028 %, *m/m*), dok najveću ima Pluronic[®] F68 (0,1 %, *m/m*) (118, 120), što znači da će kod nanoemulzija pripremljenih s Pluronic[®]-om F68 micelle u vanjskoj fazi biti prisutne tek pri većim koncentracijama navedene površinski aktivne tvari. HLB vrijednost govori o masenom udjelu hidrofilnog, višestruko etoksiliranog dijela u strukturi molekule površinski aktivne tvari te što je taj udio veći, površinski aktivna tvar je topljivija u vodi (118). Smatra se da su za pripremu nanoemulzija U/V tipa najprikladnije neionske površinski aktivne tvari HLB vrijednosti između 8 i 16 (61), poput Tween[®]-a 60 (HLB 14,9), Tween[®]-a 80 (HLB 15) i Kolliphor[®]-a EL (HLB 12-14). Za razliku od njih, Pluronic[®] F68 ima značajno veću HLB vrijednost (HLB 29), što ga čini izrazito hidrofilnim (118, 119). Ipak, uspješna priprema nanoemulzija korištenjem Pluronic[®]-a F68 kao površinski aktivne tvari također je opisana u literaturi (47, 121, 122). 64 različite formulacije (u duplikatu) pripremljene su korištenjem mikrofluidizatora primjenom jednakih procesnih parametara (1000 bara, 10 ciklusa) kako bi se ispitaio utjecaj formulacijskih parametara (vrste ulja te vrste i udjela neionskih površinski aktivnih tvari) na veličinu kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija, a rezultati su prikazani u tablici 3. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da je vrsta korištenog ulja imala značajan utjecaj na veličinu kapljica nanoemulzija, što je vjerojatno posljedica različite viskoznosti odabranih ulja. Poznato je da je u pripravi nanoemulzija visokoenergetskim metodama smanjenje veličine kapljica otežano kada se kao uljna faza koriste jako viskozna ulja (40). Kapljice se tada opiru dijeljenju te se, umjesto toga, primjenom sile rotiraju oko vlastite osi pa tako nastaju nanoemulzije s kapljicama većih dimenzija. Rotacijskim testom pri kontroliranoj brzini smicanja izmjerena je viskoznost ulja korištenih u pripravi nanoemulzija. Korištena ulja ponašaju se kao Newtonovi sustavi te njihova viskoznost ne ovisi o primijenjenoj sili, odnosno brzini smicanja. Viskoznost ricinusovog ulja iznosi 704,37 ± 14,85 mPas, Miglyol[®]-a 812 22,91 ± 0,05 mPas, sezamovog ulja 55,89 ± 0,13 mPas, a sojinog ulja 54,91 ± 0,21 mPas. Sukladno tome, najveće kapljice izmjerene su kod

nanoemulzija pripremljenih s najviskoznijim ricinusovim uljem, dok su nanoemulzije pripremljene s Miglyol[®]-om 812, uljem najmanje viskoznosti, imale najmanje kapljice. Sama vrsta korištene površinski aktivne tvari nije pokazala značajan utjecaj na veličinu kapljica nanoemulzija, no povećanje udjela pojedine površinski aktivne tvari očekivano je uzrokovalo značajno smanjenje veličine kapljica. Korištenjem većih udjela površinski aktivne tvari molekule površinski aktivne tvari, tijekom pripreme nanoemulzije upotrebom mikrofluidizatora, prisutne su u vodenoj fazi u suvišku te su dostupne za prekrivanje površine i stabilizaciju novonastalih uljnih kapljica. Taj se proces događa brže što je koncentracija površinski aktivne tvari u vodenoj fazi veća (123, 124). Također, poznato je da površinski aktivne tvari smanjuju površinsku napetost na granici faza te tako olakšavaju smanjenje veličine kapljica nanoemulzije (125). S obzirom na to da su u pripravi nanoemulzija korištene samo neionske površinski aktivne tvari, izmjereni zeta-potencijal svih nanoemulzija bio je blago negativan (tablica 3), što je moguće objasniti adsorpcijom hidroksidnih iona iz vodene faze na površinu uljnih kapljica (46) ili orijentacijom slobodnih masnih kiselina iz uljne faze prema površini uljnih kapljica (47). Sljedeći korak bio je uklapanje stearilamina u formulaciju. Za taj je korak odabrana nanoemulzija s 5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812 i 2,5 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL jer je kod te formulacije postignuta najmanja veličina kapljica, uz PDI manji od 0,2.

Tablica 3. Veličina kapljica, indeks polidisperznosti (PDI) i zeta-potencijal nanoemulzija pripremljenih korištenjem različitih ulja, različitih neionskih površinski aktivnih tvari (PAT) te različitih udjela neionskih PAT.

Ulje	PAT	PAT (%, <i>m/m</i>)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
Ricinusovo ulje	Kolliphor® EL	0,5	374,8±1,6	0,205±0,051	-11,2±0,5
		1	281,0±2,8	0,270±0,038	-8,6±0,7
		2,5	231,1±3,3	0,448±0,119	-7,2±0,4
		5	212,5±2,7	0,419±0,006	-6,7±0,5
	Pluronic® F68	0,5	407,6±3,6	0,315±0,054	-12,2±0,9
		1	340,9±2,2	0,268±0,058	-9,9±0,9
		2,5	258,3±2,5	0,212±0,034	-6,0±0,7
		5	223,5±3,9	0,268±0,021	-5,0±0,4
	Tween® 60	0,5	458,0±2,8	0,100±0,071	-7,5±0,7
		1	380,9±4,2	0,235±0,075	-5,9±0,1
		2,5	275,5±3,0	0,238±0,026	-5,5±0,1
		5	227,6±4,2	0,323±0,048	-5,0±0,3
	Tween® 80	0,5	448,7±11,4	0,250±0,247	-8,6±0,4
		1	367,7±3,0	0,274±0,069	-3,1±0,5
		2,5	282,0±3,7	0,233±0,018	-2,5±0,6
		5	238,5±1,7	0,351±0,069	-2,2±0,2
Miglyol® 812	Kolliphor® EL	0,5	205,3±2,1	0,089±0,007	-7,0±0,7
		1	158,7±2,5	0,093±0,020	-4,5±0,5
		2,5	98,5±0,7	0,160±0,007	-4,3±0,7

		5	65,1±0,7	0,216±0,002	-2,2±0,5
Pluronic® F68		0,5	225,5±1,4	0,135±0,019	-1,3±0,3
		1	190,8±1,8	0,134±0,008	-1,3±0,5
		2,5	137,9±0,7	0,143±0,012	-1,9±0,6
		5	95,9±0,6	0,171±0,023	-1,3±0,3
Tween® 60		0,5	197,3±2,4	0,115±0,031	-14,1±0,6
		1	160,6±1,4	0,144±0,010	-12,3±0,6
		2,5	114,7±1,5	0,289±0,030	-11,0±0,6
		5	79,5±0,7	0,348±0,024	-8,2±0,5
Tween® 80		0,5	196,3±1,1	0,131±0,005	-10,7±0,5
		1	154,6±1,3	0,184±0,027	-6,0±0,5
		2,5	108,5±0,5	0,286±0,020	-2,2±0,6
		5	78,2±0,7	0,361±0,046	-1,4±0,8
Sezamovo ulje	Kolliphor® EL	0,5	247,6±3,9	0,093±0,039	-2,9±0,6
		1	198,5±3,0	0,134±0,016	-2,5±0,4
		2,5	132,2±1,9	0,271±0,023	-2,3±0,7
		5	92,7±0,8	0,371±0,030	-1,9±0,6
Pluronic® F68		0,5	257,9±4,5	0,140±0,080	-2,2±0,5
		1	231,2±4,6	0,114±0,031	-1,9±0,5
		2,5	182,2±2,7	0,188±0,030	-1,0±0,2
		5	146,6±4,3	0,245±0,113	-0,9±0,9
Tween® 60		0,5	243,1±6,1	0,016±0,016	-5,4±0,5
		1	205,4±2,7	0,108±0,052	-7,3±0,6
		2,5	143,6±3,9	0,222±0,002	-6,1±0,4

		5	86,8±1,8	0,349±0,034	-6,2±0,6
	Tween® 80	0,5	233,8±2,7	0,099±0,032	-3,2±0,5
		1	193,5±3,2	0,105±0,008	-2,3±0,5
		2,5	138,3±2,4	0,199±0,020	-2,9±0,5
		5	93,0±2,1	0,340±0,028	-2,7±0,5
Sojino ulje	Kolliphor®	0,5	236,2±3,3	0,148±0,090	-7,1±0,2
	EL	1	190,8±3,1	0,097±0,036	-5,2±0,7
		2,5	118,4±2,4	0,181±0,019	-4,2±0,8
		5	87,8±1,3	0,383±0,011	-3,7±0,3
	Pluronic®	0,5	253,7±6,3	0,124±0,006	-4,4±0,3
	F68	1	229,1±6,2	0,121±0,033	-3,4±0,5
		2,5	179,9±4,4	0,050±0,040	-2,8±0,5
		5	145,4±2,4	0,212±0,045	-3,6±1,2
	Tween® 60	0,5	238,3±3,8	0,127±0,022	-6,4±0,4
		1	195,6±2,8	0,167±0,003	-5,2±0,3
		2,5	115,3±1,3	0,336±0,039	-5,5±0,4
		5	83,8±0,9	0,429±0,049	-5,5±0,3
	Tween® 80	0,5	245,1±5,9	0,076±0,055	-9,0±0,3
		1	205,9±5,1	0,131±0,021	-4,0±0,6
		2,5	149,2±3,8	0,231±0,007	-1,6±0,2
		5	99,8±2,4	0,314±0,017	-0,9±0,8

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

4.1.2. Fizičko-kemijska svojstva pripremljenih primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom

S ciljem postizanja pozitivnog naboja na površini kapljica, bitnog za interakciju nanoemulzije s površinom oka, slijedilo je uklapanje kationskog lipida stearilamina u odabranu formulu (Miglyol[®] 812 5 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 2,5 % (*m/m*) i pročišćena voda do 100 % (*m/m*)). Zbog slabe topljivosti stearilamina u Miglyol[®]-u 812 pri sobnoj temperaturi, uljna i vodena faza su neposredno prije miješanja zagrijane na 70 °C, što je omogućilo potpuno otapanje stearilamina u Miglyol[®]-u 812. Pripremljene su ukupno 4 formulacije (u duplikatu) s rastućim udjelima stearilamina (0,01-0,3 %, *m/m*). Za izotonizaciju formulacija korišten je glicerol (2,5 %, *m/m*). Glicerol je molekula neutralnog naboja te je prikladan za izotonizaciju kationskih nanoemulzija jer nema utjecaj na njihov naboj (126). Također, glicerol posjeduje kratkotrajan osmoprotektivni učinak (127), koji kod bolesti suhog oka može smanjiti oštećenje epitelnih stanica površine oka uzrokovano hiperosmotskim stresom. Provedena je detaljna fizičko-kemijska karakterizacija pripremljenih nanoemulzija, a rezultati su prikazani u tablici 4.

Sve pripremljene nanoemulzije mliječno su bijelog izgleda i tekuće konzistencije. Veličina kapljica pripremljenih nanoemulzija manja je od 100 nm (81,0-95,6 nm), a PDI manji ili oko 0,2. Primijećen je blagi porast veličine kapljica i porast PDI s povećanjem udjela stearilamina. Porast veličine kapljica s 204 nm (PDI 0,22) na 252 nm (PDI 0,26) primijećen je i nakon uklapanja stearilamina (2 %, *m/V*) u nanoemulziju s 10 % (*m/V*) skvalena i 3 % (*m/V*) lecitina iz žumanjka jajeta pripremljenu ultrasonikacijom, a kao moguće objašnjenje navodi se porast viskoznosti nanoemulzije uzrokovan dodatkom stearilamina (128). Poznato je da je kod povećane viskoznosti uljne faze smanjenje veličine kapljica tijekom pripreme nanoemulzija visokoenergetskim metodama otežano (40), stoga je moguće da je i u slučaju primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada blago povećanje viskoznosti uljne faze nakon dodatka stearilamina uzrokovalo blago povećanje veličine kapljica i PDI.

Obrat vrijednosti zeta-potencijala iz negativnih u pozitivne očekivano je nastupio dodatkom stearilamina u formulu. Vrijednosti zeta-potencijala pozitivnije su što je udio stearilamina u formuli veći te iznose 3,1-25,5 mV. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima određivanja zeta-potencijala nanoemulzija pripremljenih metodom spontanog emulgiranja, koje su sadržavale 8 % (*m/m*) triglicerida srednje duljine lanaca, 2 % (*m/m*) lecitina, 2,25 % (*m/m*) glicerola i rastući udio stearilamina (0,0005-0,5 %, *m/m*). Povećanje udjela stearilamina do 0,05 % (*m/m*)

uzrokovalo je porast zeta-potencijala s približno -25 na približno 50 mV, dok daljnje povećanje udjela stearilamina nije dovelo do dodatnog povećanja vrijednosti zeta-potencijala zbog zasićenja površine kapljica molekulama stearilamina (54). Veće izmjerene vrijednosti zeta-potencijala pri istom ili sličnom sadržaju stearilamina kao kod nanoemulzija pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada moguće je objasniti različitim sastavom nanoemulzija, ali i korištenjem vodene otopine NaCl manje koncentracije (1 mM) za razrjeđivanje nanoemulzija prije mjerenja (89).

pH vrijednosti pripremljenih nanoemulzija unutar su raspona prikladnog za oftalmičku primjenu (6,76-8,69). Primijećen je porast pH s povećanjem udjela stearilamina, što je posljedica protonacije primarnih amino skupina kationskog lipida (pKa 10,6) (54). Izostavljanjem pufera iz formulacije puferski kapacitet suza omogućuje brzi povrat pH na fiziološke vrijednosti, nakon primjene pripravka čiji se pH razlikuje od pH suza (78).

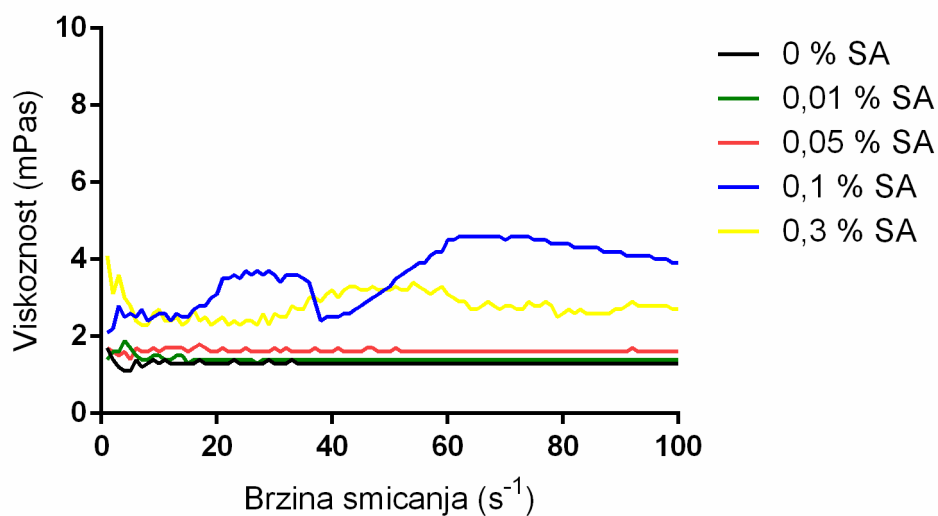
Reološka karakterizacija (slika 9) pokazala je da su pripravljene nanoemulzije Newtonovi sustavi male viskoznosti (1,32-3,31 mPas), što omogućuje njihovu jednostavnu primjenu u obliku kapi za oko i točnost doziranja. Uočen je blagi porast viskoznosti s povećanjem udjela stearilamina u formulaciji, što se opet može pripisati povećanju viskoznosti uljne faze dodatkom stearilamina, koja pridonosi ukupnom povećanju viskoznosti nanoemulzije.

Mjerenja površinske napetosti rađena su pri 25 °C kako bi dobivene vrijednosti bile usporedive s literaturnim vrijednostima površinske napetosti suznog filma, koje su također dobivene mjerenjem pri 25 °C. Izmjerena površinska napetost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom je 31,3-35,0 mN m⁻¹ te je uočeno smanjenje površinske napetosti s porastom udjela stearilamina u formulaciji. To je očekivano s obzirom na površinski aktivna svojstva stearilamina. Kako primjena kapi za oko čija je površinska napetost manja od 35 mN m⁻¹ može izazvati osjećaj boli i nelagode (92), moguće je da su nanoemulzije s više od 0,05 % (m/m) stearilamina manje prikladne za oftalmičku primjenu. Ipak, kako su kod bolesti suhog oka izmjerene povećane vrijednosti površinske napetosti, koje su povezane sa smanjenom stabilnošću suznog filma (5), donošenje konkretnih zaključaka moguće je tek nakon kliničkih ispitivanja provedenih na dobrovoljcima s dijagnozom bolesti suhog oka.

Tablica 4. Fizičko-kemijska svojstva (veličina kapljica, indeks polidisperznosti (PDI), zeta-potencijal, pH, viskoznost i površinska napetost) nanoemulzija sa stearylaminom (SA).

SA (% m/m)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta- potencijal (mV)	pH	Viskoznost (mPas)	Površinska napetost (mN m ⁻¹)
0	81,2±0,4	0,110±0,007	-2,0±0,5	6,76±0,12	1,32±0,01	34,5±1,2
0,01	81,0±0,4	0,139±0,017	3,1±0,5	6,82±0,14	1,40±0,02	35,0±0,4
0,05	86,0±0,4	0,228±0,005	13,2±1,2	7,03±0,12	1,71±0,07	34,6±0,4
0,1	89,9±0,5	0,236±0,005	20,3±1,3	7,78±0,19	3,31±0,32	32,7±0,6
0,3	95,6±2,8	0,251±0,012	25,5±2,15	8,69±0,31	2,80±0,30	31,3±1,0

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

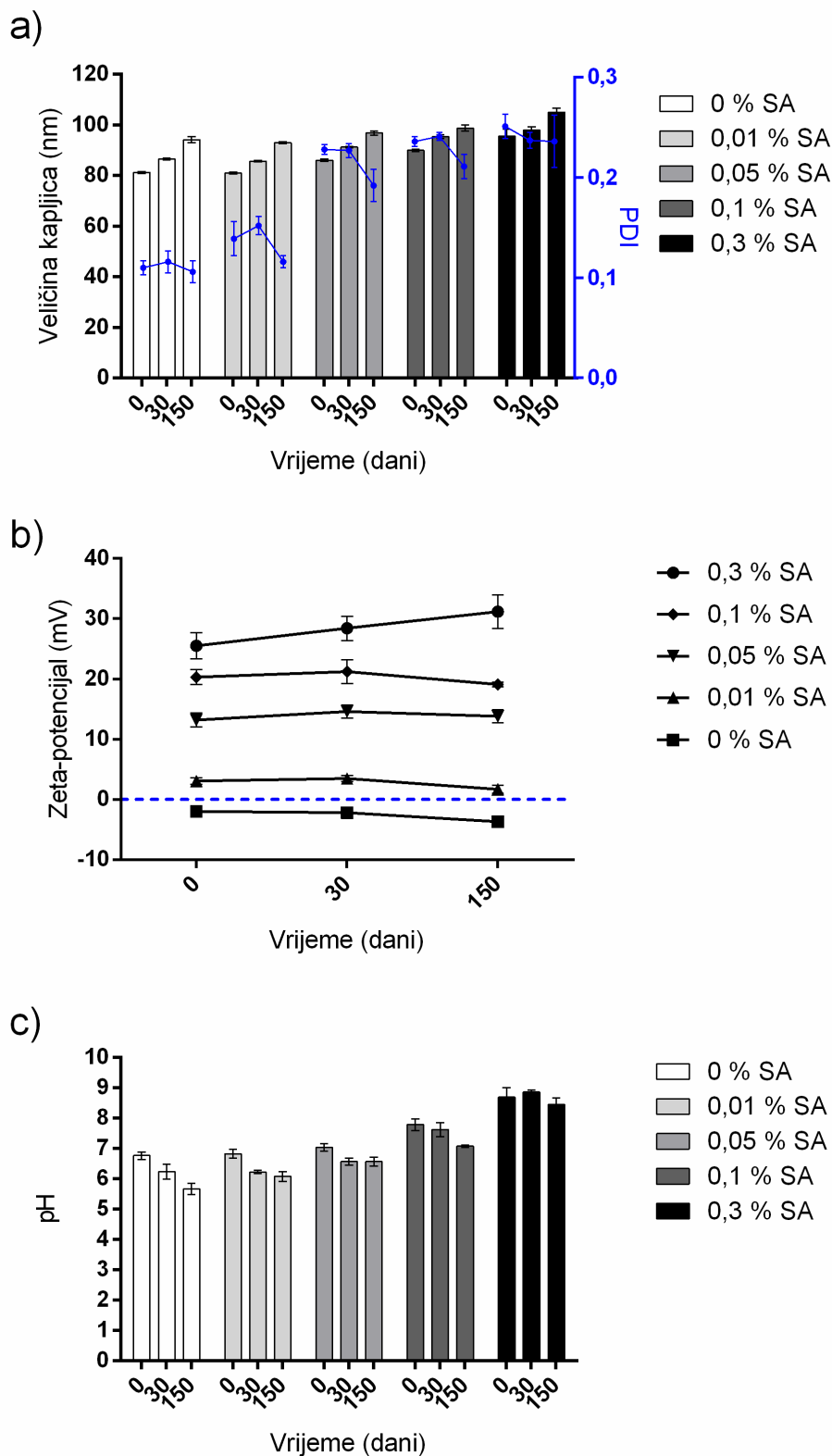


Slika 9. Krivulje viskoznosti nanoemulzija s različitim udjelima stearylamina (SA).

4.1.3. Stabilnost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom

Za pripravljene nanoemulzije očekuje se dobra stabilnost zbog dvojakog mehanizma stabilizacije: Kolliphor® EL omogućuje steričku stabilizaciju sustava, dok dodatak stearylamina u formulaciju pridonosi elektrostatskoj stabilizaciji sustava povećanjem apsolutne vrijednosti

zeta-potencijala. Ispitivanja stabilnosti provedena su u realnom vremenu tijekom 5 mjeseci (150 dana) pri 4 °C. U svrhu ispitivanja fizičke stabilnosti nanoemulzija mjerena je veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal, dok je radi praćenja kemijske stabilnosti nanoemulzija mjeren pH. Rezultati stabilnosti prikazani su slikom 10. 150 dana nakon pripreve izgled nanoemulzija ostao je nepromijenjen te nije uočeno vrhnjenje niti razdvajanje faza. Uočen je blagi porast veličine kapljica (za oko 10 nm), koje su se i dalje nalazile u nanometarskom području (93,0-105,0 nm), uz blago smanjenje PDI, dok kod zeta-potencijala nisu uočene bitne promjene. Dobiveni rezultati ukazuju na zadovoljavajuću fizičku stabilnost pripremljenih nanoemulzija. Praćenjem kemijske stabilnosti nanoemulzija tijekom pohrane uočen je blagi pad pH vrijednosti (6,07-8,45), što je najvjerojatnije posljedica oslobađanja masnih kiselina iz uljne faze (129). Ipak, pH vrijednosti nanoemulzija ostale su unutar raspona prikladnog za oftalmičku primjenu.

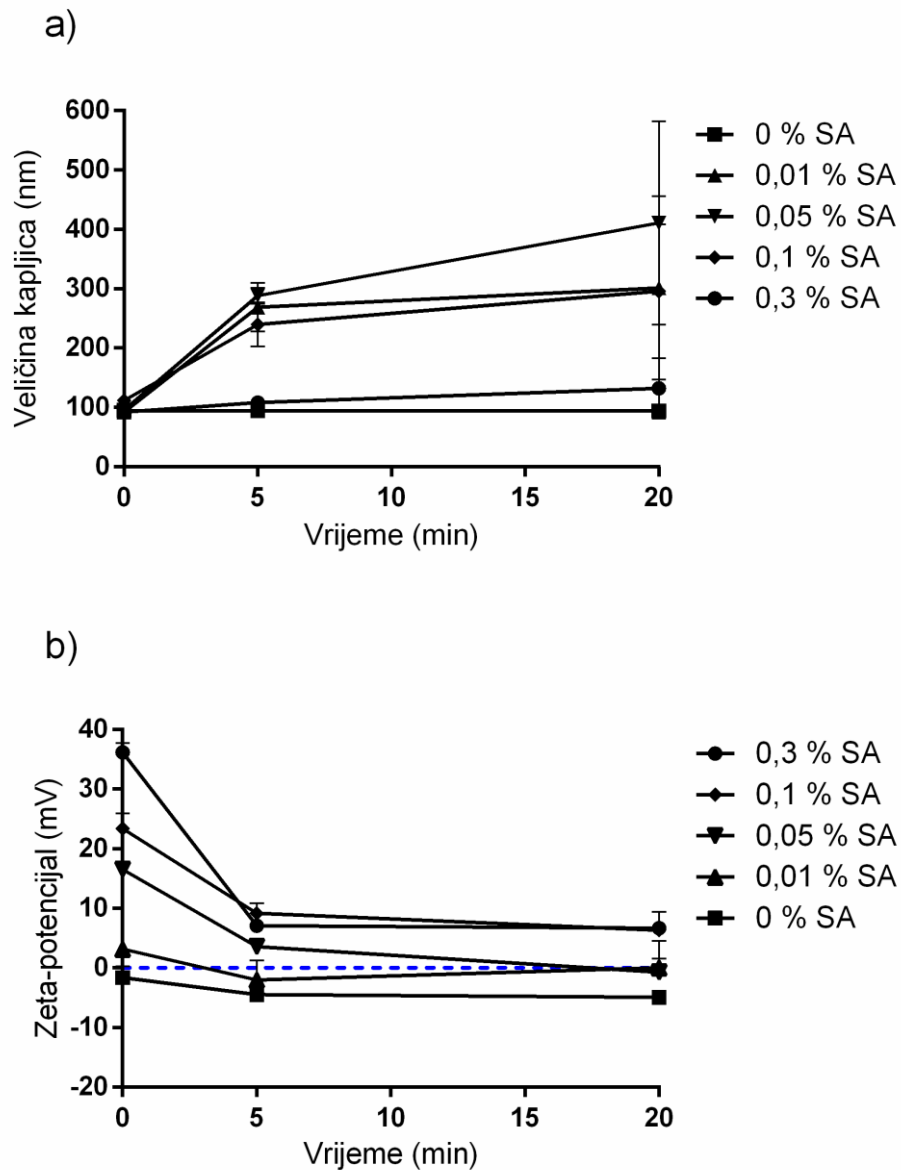


Slika 10. a) veličina kapljica i indeks polidisperznosti (PDI), b) zeta-potencijal i c) pH primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom (SA) izmjereni na dan priprave (dan 0) te nakon 30 i 150 dana pohrane pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$). Nanoemulzija bez stearylamina (0 % SA) prikazana je kao kontrolna formulacija.

4.1.4. Interakcija primarnih kationskih nanoemulzija s mucinom

Mehanizam produljenog zadržavanja kationskih nanosustava sa stearylaminom na površini oka uključuje elektrostatske interakcije, ali i vodikove veze te hidrofobne interakcije s negativno nabijenim mucinima (130). Mukoadhezivna svojstva pripremljenih nanoemulzija ispitana su reološkom metodom pri kontroliranoj brzini smicanja, nakon miješanja s disperzijom mucina (20 %, *m/m*) u STF-u. Kod ponovljenih mjerenja uočena su velika odstupanja u dobivenim rezultatima (koji nisu prikazani). Izračunate η_b za sve formulacije iznosile su oko 100 mPas, čak i za kontrolnu formulaciju bez stearylamina, što ukazuje na to da su formulacije mukoadhezivne te da uklapanje stearylamina ne utječe na njihovu interakciju s mucinom. Dobiveni rezultati nisu u skladu s očekivanjima, što je moguće objasniti činjenicom da je korištena reološka metoda prikladnija za ispitivanje mukoadhezivnosti polimera (106, 109) ili formulacija koje sadrže polimere (110). Iz tog je razloga mukoadhezivnost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom ispitana i drugom metodom, koja je prethodno razvijena za ispitivanje interakcije mukusa i nanočestica za oralnu primjenu s kondroitinsulfatom i kitozanom (114). Kako bi metoda bila prikladnija za ispitivanje mukoadhezivnosti nanoemulzija za oftalmičku primjenu, u metodi su napravljene određene promjene. Nanoemulzije su pomiješane s disperzijom mucina (1 %, *m/m*) u STF-u, u omjeru 40:7 (V/V) te je interakcija nanoemulzija i mucina praćena mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala tijekom 20 minuta (slika 11). Omjer u kojem su nanoemulzije pomiješane s disperzijom mucina odabran je na temelju prosječnog volumena kapi za oko (40 μ L) i prosječnog volumena suznog filma (7 μ L) (98, 131). Nakon miješanja očekuje se adsorpcija negativno nabijenih lanaca mucina na površinu uljnih kapljica nanoemulzija, što se očituje kao porast u veličini kapljica te kao pomak zeta-potencijala prema negativnijim vrijednostima. Već 5 minuta nakon miješanja nanoemulzija s disperzijom mucina uočen je nagli porast veličine kapljica do gotovo 300 nm, koji je popraćen naglim smanjenjem vrijednosti zeta-potencijala. Suprotno očekivanjima, kod nanoemulzije s najvećim udjelom stearylamina (0,3 %, *m/m*) nije zapažen porast veličine kapljica niti nakon 20 minuta miješanja s disperzijom mucina. Ipak, kod iste je formulacije uočen nagli pad zeta-potencijala već nakon 5 minuta. Opisane promjene veličine kapljica i zeta-potencijala dokaz su interakcije nanoemulzija i mucina. Sukladno očekivanjima, miješanje kontrolne formulacije bez stearylamina s disperzijom mucina nije uzrokovalo porast veličine kapljica, kao ni pomak zeta-potencijala prema negativnijim vrijednostima. Temeljem dobivenih rezultata moguće je očekivati mukoadhezivni učinak i

produljeno zadržavanje pripremljenih nanoemulzija na površini oka *in vivo*, što je potrebno potvrditi dodatnim ispitivanjima.

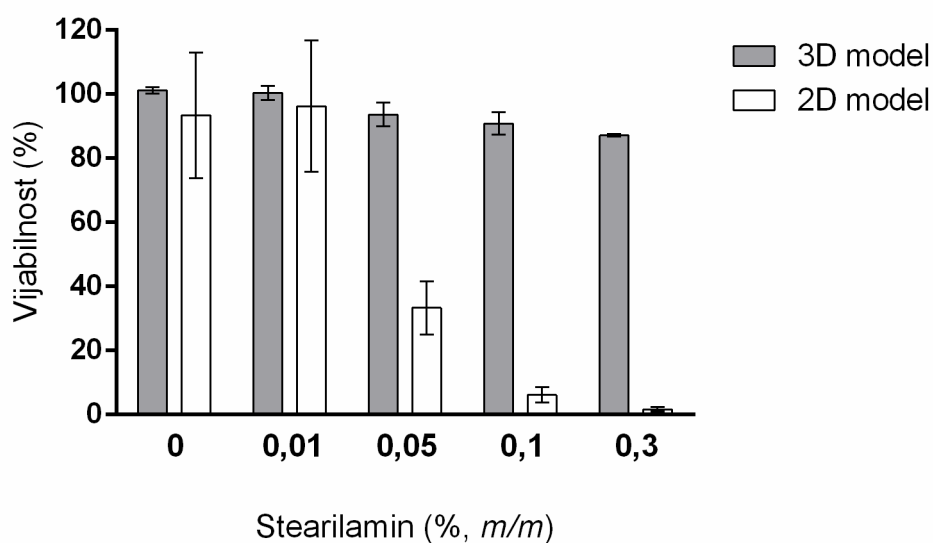


Slika 11. a) veličina kapljica i b) zeta-potencijal primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom (SA) izmjereni prije te 5 i 20 minuta nakon miješanja s disperzijom mucina (1 %, *m/m*) u omjeru 40:7 (V/V). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 2$). Nanoemulzija bez stearylamina (0 % SA) korištena je kao kontrolna formulacija.

4.1.5. Ispitivanje biokompatibilnosti primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom

Razvoj sigurnih i učinkovitih formulacija skup je i dugotrajan proces, a rizik od neuspjeha u pojedinim fazama razvoja je velik. Prije ispitivanja na životinjama provode se preliminarna *in vitro* ispitivanja koja se još uvijek najčešće provode na staničnim monoslojevima, odnosno na 2D staničnim modelima. Iako su ti modeli relativno jeftini i jednostavni za uzgoj te omogućuju ispitivanje velikog broja uzoraka u jedinici vremena u kontroliranim uvjetima, oni ne simuliraju stvarno okruženje i rast stanica *in vivo* jer im nedostaju međustanične interakcije koje postoje unutar složene 3D arhitekture tkiva. Kako bi se povećala relevantnost rezultata preliminarnih ispitivanja, nužan je razvoj robusnih 3D staničnih modela jednostavnih za uzgoj, kojima je moguće pouzdano predvidjeti učinak ispitivane formulacije, čime bi se poboljšala *in vitro* – *in vivo* korelacija i u konačnici smanjio broj životinja u pretkliničkim ispitivanjima (132). Biokompatibilnost primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom ispitana je na 2 stanična modela uzgojena korištenjem HCE-T stanične linije humanog epitela rožnice: na 2D modelu (monosloju stanica) i na 3D modelu (višesloju stanica). Rezultati ispitivanja prikazani su slikom 12. Dok nanoemulzija bez stearilamina nije pokazala toksičan učinak na 2D modelu, dodatak stearilamina u formulaciju u količini većoj od 0,01 % (*m/m*) uzrokovao je značajan pad vijabilnosti 2D modela. Toksičnost nanoemulzija sa stearilaminom potvrđena je i na drugim 2D staničnim modelima (Hep G2 hepatocitima (54), HaCaT keratinocitima kože, 3T3 mišjim fibroblastima i J774 makrofagima (133)), a moguće objašnjenje je narušavanje funkcije i integriteta stanične membrane zbog interakcije pozitivno nabijenih kapljica nanoemulzija s negativno nabijenim fosfolipidima stanične membrane te poticanje apoptoze stanica. Međutim, ispitivanje toksičnosti nanoemulzija s 0,3 % (*m/m*) stearilamina, namijenjenih za oftalmičku ili parenteralnu primjenu, provedeno na 3 različita životinjska modela pokazalo je da nanoemulzije ne uzrokuju oštećenje površine oka kunića nakon uzastopne petodnevne primjene (8 puta dnevno), da primjena nanoemulzija u obliku intravenskog bolusa ne uzrokuje akutnu toksičnost kod miševa te da primjena nanoemulzija u obliku intravenske infuzije tijekom 2 sata ne dovodi do akutne neurotoksičnosti kod štakora (55). S obzirom na kontradiktornost rezultata dobivenih na spomenutim staničnim i životinjskim modelima, moguće je zaključiti da korišteni 2D stanični modeli, pa tako i 2D HCE-T model korišten u sklopu ovog doktorskog rada, pokazuju pretjeranu osjetljivost i toksičnost nakon inkubacije s pozitivno nabijenim nanoemulzijama sa stearilaminom te da stoga nisu prikladni za predviđanje toksičnosti nanoemulzija *in vivo*. S druge strane, pripravljene nanoemulzije nisu narušile vijabilnost 3D modela, koja je čak i nakon izlaganja nanoemulzijama s najvećim udjelom stearilamina iznosila

oko 90 %. Glavna značajka korištenog 3D modela je stratificirani višeslojni epitel karakterističan za epitel rožnice, uz slabija barijerna svojstva ($TEER \sim 90 \Omega\text{cm}^2$) u odnosu na ona *in vivo* (101). Rezultati biokompatibilnosti primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom dobiveni nakon ispitivanja na 3D modelu u skladu su s prethodnim rezultatima *in vivo* (55), što je moguće objasniti činjenicom da korišteni 3D model bolje oponaša epitel rožnice *in vivo*, kao i koncentracijski gradijent nutrijenata i tvari u samom epitelu. Korištenjem prikladnih eksperimentalnih alata moguće je izbjeći donošenje pogrešnih zaključaka o toksičnosti formulacija u najranijim fazama razvoja, što je preduvjet za nastavak istraživanja.



Slika 12. Vijabilnost (%) 3D ($n = 2$) i 2D ($n = 5$) HCE-T modela određena pomoću MTT testa nakon 30 minuta inkubacije s nanoemulzijama razrijeđenim $10 \times (V/V)$ u HBSS puferu pH 7,4. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Stanice inkubirane s čistim HBSS puferom pH 7,4 korištene su kao kontrola (vijabilnost = 100 %).

Primarne kationske nanoemulzije sa stearilaminom razvijene u sklopu ovog doktorskog rada pokazuju veliki potencijal za primjenu u liječenju bolesti suhog oka zbog prikladnih fizičko-kemijskih svojstava, malog iritacijskog potencijala te potencijala za produljeno zadržavanje na površini oka nakon primjene. Takve bi se funkcionalne formulacije mogle koristiti za nadoknadu i stabilizaciju suznog filma te posljedično smanjenje simptoma bolesti suhog oka ili kao tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari za liječenje bolesti suhog oka.

4.2. RAZVOJ SEKUNDARNIH KATIONSКИH NANOEMULZIJA S KITOZANOM

Unatoč rastućoj učestalosti u populaciji za liječenje bolesti suhog oka još uvijek postoji vrlo ograničen broj odobrenih lijekova (15, 41). Kod teških oblika bolesti najčešće se propisuju kapi za oko s ciklosporinom A, dok se liječenje blagih i umjerenih oblika često svodi na primjenu umjetnih suza. Nastup djelovanja ciklosporina A je odgođen, a s obzirom na to da se simptomi bolesti najčešće vraćaju nakon prestanka primjene, potrebno ga je primjenjivati tijekom duljeg razdoblja (134). Kratkotrajna topikalna primjena glukokortikoida na samom početku primjene ciklosporina A može ubrzati smanjenje simptoma bolesti te tako povećati ustrajnost pacijenata nad primjenom propisane terapije. Također, topikalni glukokortikoidi mogu se primjenjivati kao samostalna terapija kod blažih oblika bolesti suhog oka, kod kojih primjena umjetnih suza nije dovoljna (15). Ipak, čak i kratkotrajna primjena topikalnih glukokortikoida može uzrokovati ozbiljne nuspojave, poput povišenog očnog tlaka, katarakte i oportunističkih infekcija (135). Kako bi se izbjegla mogućnost nastanka takvih nuspojava, umjesto glukokortikoida mogli bi se primjenjivati topikalni NSAR. Kliničko ispitivanje na 52 dobrovoljaca s dijagnozom bolesti suhog oka provedeno je kako bi se ispitalo ima li istovremena primjena komercijalno dostupnih kapi za oko u obliku otopine s 0,4 % ketorolaka (Acular LS[®], Allergan) učinak na podnošljivost početne primjene komercijalno dostupnih kapi za oko s ciklosporinom A (Restasis[®]) te na smanjenje kliničkih znakova i simptoma bolesti (136). Rezultati ispitivanja, koje je trajalo 6 tjedana, pokazali su kako istovremena primjena ketorolaka smanjuje subjektivne simptome bolesti, što se nakon dvotjedne primjene pokazalo i statistički značajnim. Osim toga, nakon 6 tjedana kombinirane terapije primijećeno je statistički značajno smanjenje oštećenja površine oka u odnosu na samostalnu primjenu ciklosporina A te nisu zabilježene nuspojave povezane s primjenom ketorolaka.

Kapi za oko s mucinskim sekretogogom rebamipidom u obliku suspenzije (2 %, Mucosta[®]) odobrene u Japanu pokazale su se učinkovitima u otklanjanju kliničkih znakova i subjektivnih simptoma bolesti suhog oka (15). Međutim, potreba za učestalom primjenom (4 puta dnevno) može negativno utjecati na adherenciju pacijenata te, posljedično, na ishode liječenja.

Uklapanje lipofilnih NSAR (poput ibuprofena) i rebamipida u funkcionalne, mukoadhezivne nanoemulzije s potencijalom za nadoknadu i stabilizaciju narušenog suznog filma moglo bi predstavljati iskorak u liječenju bolesti suhog oka.

4.2.1. Odabir uljne faze i površinski aktivnih tvari

Sekundarne nanoemulzije obložene suprotno nabijenim polielektrolitom (primjerice polisaharidima, površinski aktivnim tvarima ili proteinima) obično se pripremaju tako da se u gotovu primarnu nanoemulziju dodaje suprotno nabijeni polielektrolit koji se djelovanjem elektrostatskih privlačnih sila smješta na samoj površini kapljica, što dovodi do promjene naboja kapljica nanoemulzije iz negativnog u pozitivni ili obrnuto (61). Sukladno tome, za pripremu sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom potrebno je pripremiti primarnu anionsku nanoemulziju negativnog zeta-potencijala. U ovom doktorskom radu lecitin izoliran iz sjemena soje (Lipoid S 45) izabran je kao anionska površinski aktivna tvar za pripremu primarnih anionskih nanoemulzija. Pojam lecitin odnosi se na smjesu fosfolipida s primjesama glikolipida i ulja, pri čemu je najzastupljeniji fosfolipid fosfatidilkolin. Fosfolipidi izgrađuju stanične membrane biljaka i životinja, stoga se lecitini smatraju jednim od najsigurnijih površinski aktivnih tvari. Kako je ukupan naboj molekule fosfatidilkolina jednak nuli, negativan naboj na površini uljnih kapljica nanoemulzija s lecitinom potječe od drugih negativno nabijenih fosfolipida (primjerice fosfatidilserina, fosfatidilinozitola ili fosfatidne kiseline) ili od slobodnih masnih kiselina (51). Lecitin korišten u ovom doktorskom radu od fosfolipida sadrži najmanje 45 % (*m/m*) fosfatidilkolina, 10-18 % (*m/m*) fosfatidiletanolamina te najviše 4 % (*m/m*) lizofosfatidilkolina. Sva 3 navedena fosfolipida sastavni su dio normalnog suznog filma (5). Štoviše, u suznom filmu oboljelih od suhog oka pronađena je značajno manja koncentracija fosfatidiletanolamina, koji se smatra ključnim za stabilizaciju lipidnog sloja suznog filma (137). Negativan naboj odabranog lecitina potječe od slobodnih masnih kiselina, od kojih je najzastupljenija linolna kiselina. Odabir najprikladnijeg ulja ovisio je, osim o prikladnosti za oftalmičku primjenu, o topljivosti odabranog lecitina. Od 4 različita ulja (ricinusovo ulje, Miglyol[®] 812, sezamovo i sojino ulje) lecitin je pri sobnoj temperaturi bilo moguće otopiti samo u Miglyol[®]-u 812, stoga je Miglyol[®] 812 izabran kao ulje za pripremu nanoemulzija. Poznato je da se stabilnost nanoemulzija s lecitinom može povećati dodatkom sekundarne, hidrofilnije površinski aktivne tvari koja omogućuje dodatno smanjenje veličine kapljica, čak i u prisustvu djelatne tvari u formulaciji (138). Nanoemulzije s 10 % (*m/m*) triglicerida srednje duljine lanaca kao uljne faze i 2 % (*m/m*) površinski aktivnih tvari, pripravljene visokotlačnom homogenizacijom (200 bara, 1-6 ciklusa), pokazale su manju veličinu kapljica kada je kao površinski aktivna tvar korištena kombinacija (1:1) lecitina iz sjemena soje (sadrži > 95 % fosfatidilkolina) i 2-heksanoillicolecitina (248-158 nm, PDI 0,12-0,04) nego kada je korišten samo lecitin (350-268 nm, PDI 0,15-0,06). Fosfolipid 2-

heksanoillicitin hidrofilniji je od fosfatidilkolina te uklapanjem između molekula fosfatidilkolina povećava fleksibilnost filma na granici faza, što olakšava smanjenje veličine kapljica nanoemulzije. Štoviše, nanoemulzija pripravljena korištenjem kombinacije fosfolipida ostala je stabilna nakon 3 mjeseca pohrane pri 25 °C, čak i nakon uklapanja indometacina. S druge strane, nanoemulzija pripravljena samo s lecitinom raspala se nakon mjesec dana pohrane, a nakon uklapanja indometacina razdvajanje faza dogodilo se nakon samo nekoliko dana.

Kao sekundarna neionska površinski aktivna tvar za pripremu sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom izabran je Kolliphor® EL, na temelju prethodnih rezultata (tablica 3) koji su pokazali zadovoljavajuća fizičko-kemijska svojstva (mala veličina kapljica i PDI) nanoemulzija pripremljenih kombinacijom Miglyol®-a 812 i Kolliphor®-a EL.

Kod izbora uljne faze u pripravi nanoemulzija za oftalmičku primjenu vrlo je važna topljivost odabrane djelatne tvari, s obzirom na to da udio uljne faze ne bi trebao biti veći od 5 % (38). U ovom doktorskom radu dvije djelatne tvari razmatrane su za uklapanje u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom: lipofilni predstavnik skupine NSAR ibuprofen i mucinski sekretogog rebamipid. Ibuprofen je slaba kiselina te se zbog slabe topljivosti u vodi i dobre permeabilnosti svrstava u skupinu II biofarmaceutskog sustava klasifikacije djelatnih tvari (engl. *biopharmaceutics classification system*, BCS) (139). Topljivost ibuprofena ispitana je pri sobnoj temperaturi u Miglyol®-u 812 te otopini lecitina u Miglyol®-u 812 (1:50, *m/m*). U oba je slučaja topljivost ibuprofena bila dovoljno dobra za nastavak istraživanja, a iznosi $92,7 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$ odnosno $101,3 \pm 3,3 \text{ mg g}^{-1}$. Rebamipid je slaba kiselina te se kao slabo topljiva i slabo permeabilna djelatna tvar svrstava u skupinu BCS IV (140). Topljivost rebamipida pri sobnoj temperaturi najprije je ispitana u Miglyol®-u 812. Kako se rebamipid pokazao potpuno netopljivim u Miglyol®-u 812, njegova je topljivost ispitana u sezamovom, sojinom te ricinusovom ulju pri sobnoj temperaturi zbog mogućnosti kombinacije Miglyol®-a 812, potrebnog za otapanje lecitina, s uljem koje bi omogućilo otapanje rebamipida. Rezultati UPLC analize pokazali su da je rebamipid potpuno netopljiv u sezamovom i sojinom ulju, dok njegova topljivost u ricinusovom ulju iznosi svega $99,2 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Udio rebamipida u komercijalno dostupnim kapima za oko u obliku suspenzije (Mucosta®) iznosi 2 %. S obzirom na topljivost, najveći udio rebamipida uklopljenog u nanoemulziju s 5 % (*m/m*) ricinusovog ulja iznosio bi samo oko 0,0005 % (*m/m*). Iz tog razloga rebamipid više nije razmatran za uklapanje u nanoemulzije.

4.2.1.1. Probir udjela lecitina

U svrhu odabira optimalnog udjela lecitina pripravljeno je 5 formulacija (u duplikatu) s 5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812 i rastućim udjelima lecitina (0,1-1 %, *m/m*) korištenjem mikrofluidizatora, uz jednake procesne parametre (1000 bara, 10 ciklusa). Pripravljene nanoemulzije mliječno su bijelog izgleda i tekuće konzistencije. Povećanjem udjela lecitina u formulaciji došlo je do značajnog smanjenja veličine kapljica, koja se s početnih 251,6 nm smanjila na 140,1 nm (tablica 5). U svim pripremljenim nanoemulzijama PDI je manji od 0,2, no nakon povećanja udjela lecitina na više od 0,75 % (*m/m*) primijećen je porast PDI. Kod svih udjela lecitina izmjereni zeta-potencijal izrazito je negativan (-40,1 – -48,8 mV). Slične vrijednosti zeta-potencijala (-54 – -61 mV) izmjerene su kod nanoemulzija pripremljenih visokotlačnom homogenizacijom, kod kojih je kao uljna faza korištena smjesa ricinusovog ulja i triglicerida srednje duljine lanaca (1:1) (10-30 %, *m/m*), a kao površinski aktivna tvar lecitin Lipoid S 75 izoliran iz sjemena soje, koji sadrži oko 70 % (*m/m*) fosfatidilkolina (141). Osim lecitina, negativnom zeta-potencijalu spomenutih nanoemulzija vjerojatno su pridonijele i slobodne masne kiseline iz ricinusovog ulja. Kako dodatak lecitina u udjelu većem od 0,1 % (*m/m*) nije doveo do značajnijeg povećanja apsolutnih vrijednosti zeta-potencijala, nanoemulzije pripravljene s najmanjim udjelom lecitina odabrane su za daljnja ispitivanja, koja su uključivala uvođenje Kolliphor[®]-a EL u formulaciju.

Tablica 5. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija pripremljenih s 5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, rastućim udjelima lecitina i pročišćenom vodom do 100 % (*m/m*).

Lecitin (% <i>m/m</i>)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
0,1	251,6±1,6	0,100±0,016	-40,1±1,5
0,25	220,1±2,4	0,089±0,018	-44,9±1,3
0,5	184,8±1,2	0,116±0,008	-46,9±1,0
0,75	160,1±1,9	0,112±0,010	-48,9±1,2
1,0	140,1±2,5	0,174±0,048	-48,8±1,2

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

4.2.1.2. Probir udjela Kolliphor[®]-a EL

Neionske površinski aktivne tvari često se u pripravi nanoemulzija koriste u kombinaciji s lecitinom jer, osim što povećavaju fluidnost sloja na granici faza, formulaciji pružaju dodatnu steričku stabilizaciju (51). Ukupno 5 formulacija (u duplikatu) s rastućim udjelima Kolliphor[®]-a EL (0,25-2,5 %, *m/m*) pripravljeno je korištenjem mikrofluidizatora (1000 bara, 10 ciklusa), a njihova je veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal prikazana u tablici 6. Očekivano, dodatak Kolliphor[®]-a EL u formulaciju uzrokovao je smanjenje veličine kapljica proporcionalno njegovom udjelu. Sve pripravljene nanoemulzije su monodisperzne, odnosno njihov je PDI manji od 0,2 (40). Ipak, primijećen je blagi porast PDI kod udjela Kolliphor[®]-a EL većeg od 1 % (*m/m*). Dodatak Kolliphor[®]-a EL utjecao je i na zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija. Povećavanjem udjela Kolliphor[®]-a EL apsolutne vrijednosti zeta-potencijala su se smanjivale, odnosno približavale su se nuli. Moguće objašnjenje je smještanje neutralnih molekula Kolliphor[®]-a EL na površini uljnih kapljica i posljedično smanjenje gustoće negativno nabijenih sastavnica lecitina na granici faza. Odabir primarne anionske nanoemulzije za daljnja ispitivanja temeljio se, ne samo na maloj veličini kapljica i PDI, nego i na zeta-potencijalu, koji je morao biti dovoljno negativan kako bi omogućio oblaganje uljnih kapljica pozitivno nabijenim molekulama kitozana i pripravu sekundarne kationske nanoemulzije. S ciljem odabira optimalne primarne anionske nanoemulzije formulacije su pomiješane s otopinom kitozana male molekulske mase (1 %, *m/m*) u omjeru 1:1 (*m/m*), a kako bi se ispitalo oblaganje površine kapljica molekulama kitozana, formulacijama je izmjeren zeta-potencijal. Jedino je zeta-potencijal formulacija s 0,25 i 0,5 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL nakon dodatka kitozana bio veći od 30 mV, dok je kod ostalih formulacija najveća izmjerena vrijednost bila tek oko 17 mV. Kako je kod formulacije s 0,5 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL izmjerena manja veličina kapljica te nešto manji PDI, ta je formulacija odabrana kao primarna anionska nanoemulzija za daljnja ispitivanja.

Tablica 6. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija pripremljenih s 5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, 0,1 % (*m/m*) lecitina, rastućim udjelima Kolliphor[®]-a EL i pročišćenom vodom do 100 % (*m/m*).

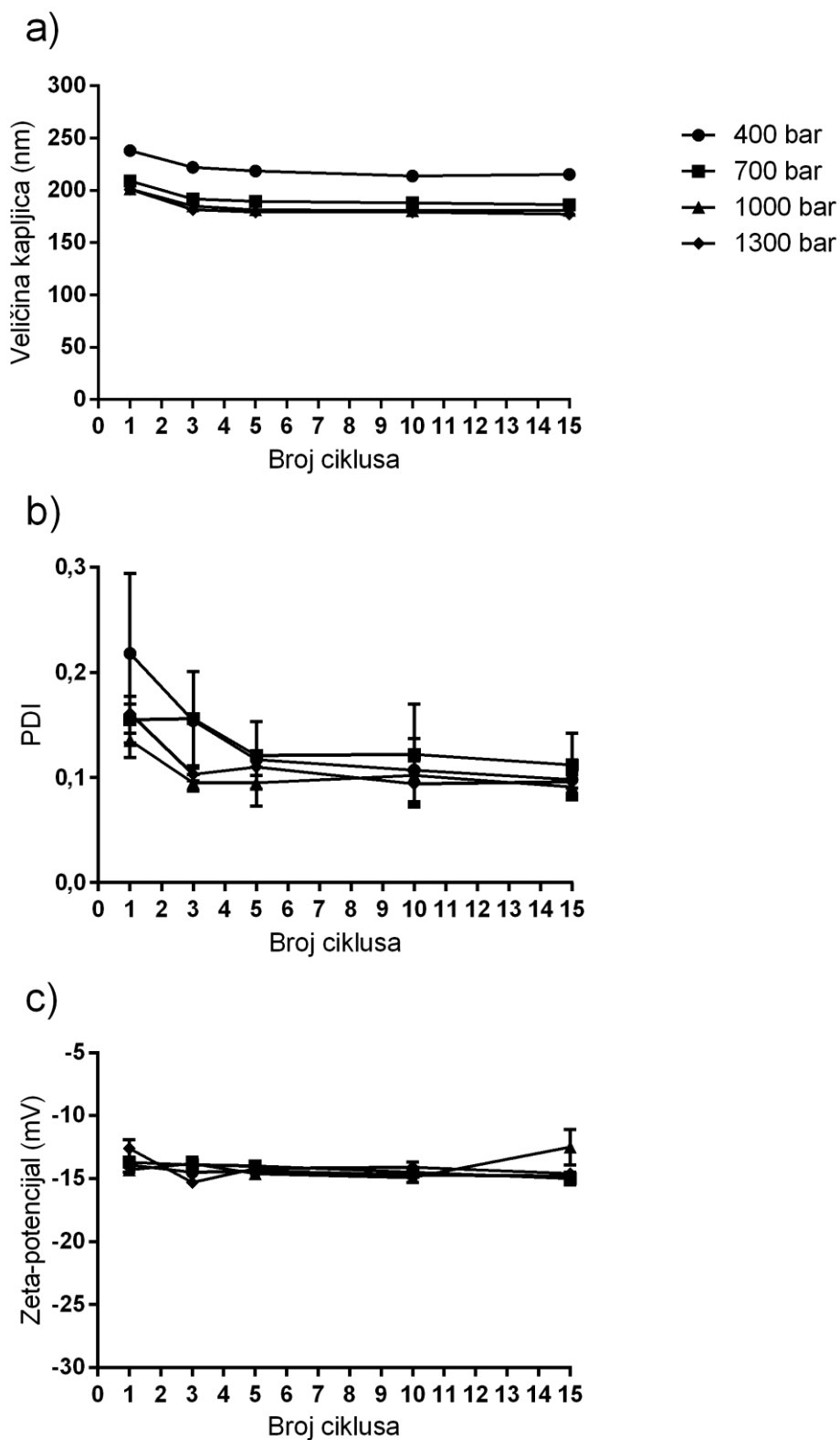
Kolliphor [®] EL (% <i>m/m</i>)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
0,25	212,3±3,8	0,112±0,017	-20,7±0,7
0,5	181,1±2,9	0,092±0,026	-15,9±0,4
1,0	138,6±1,8	0,108±0,017	-13,0±0,4
2,0	99,1±1,9	0,176±0,019	-6,2±0,6
2,5	83,6±1,2	0,201±0,018	-3,6±0,3

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

4.2.2. Optimizacija procesnih parametara

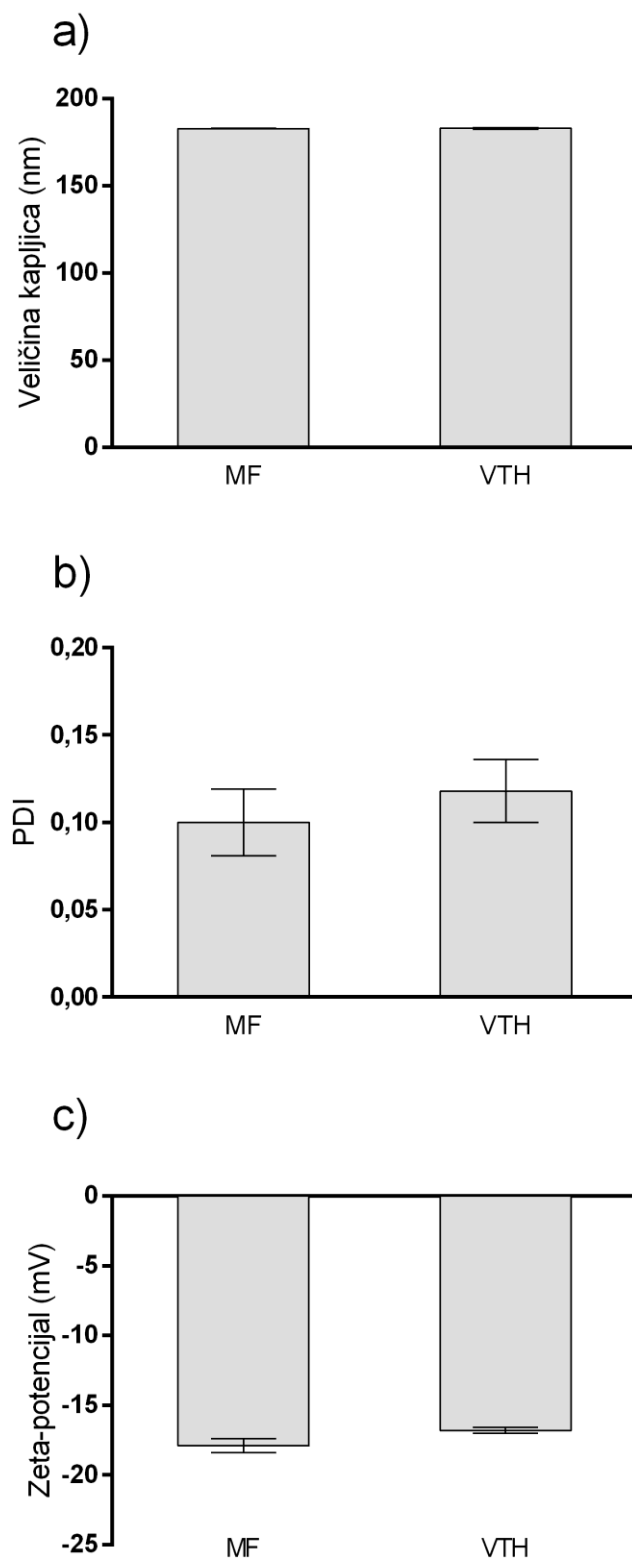
Uz pažljiv odabir vrste i udjela pomoćnih tvari, tijekom razvoja formulacije bitno je ispitati i utjecaj procesnih parametara na njezina fizičko-kemijska svojstva. Kod pripreme nanoemulzija mikrofluidizacijom ili visokotlačnom homogenizacijom moguće je utjecati na primijenjeni tlak i broj ciklusa. Sistematičnim mijenjanjem tlaka i broja ciklusa moguće je postići željenu veličinu kapljica i PDI nanoemulzije uz najmanji mogući utrošak energije, stoga je nakon odabira formulacijskih parametara (vrste i udjela ulja i površinski aktivnih tvari) slijedila optimizacija procesnih parametara na odabranoj formulaciji (Miglyol[®] 812 5 % (*m/m*), lecitin 0,1 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 0,5 % (*m/m*) i pročišćena voda do 100 % (*m/m*)). Kako je princip rada mikrofluidizatora vrlo sličan principu rada visokotlačnog homogenizatora, ispitana je i mogućnost pripreme navedene formulacije na visokotlačnom homogenizatoru primjenom tlaka i broja ciklusa prethodno optimiziranih na mikrofluidizatoru. Mogućnost prijenosa procesa pripreme formulacije na drugi tip uređaja pruža veliku fleksibilnost, što može biti ključno u slučaju nedostupnosti određenog tipa uređaja, a može biti od velikog značaja i u industrijskoj pripremi nanoemulzija. Optimizacija procesnih parametara mikrofluidizatora provedena je postupnim povećavanjem tlaka (400-1300 bara) i broja ciklusa (1-15). Za svaku kombinaciju tlaka i broja ciklusa izmjerena je veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal pripravljene nanoemulzije. Rezultati su grafički prikazani slikom 13. Postupnim povećanjem tlaka s 400 na 1000 bara došlo je do smanjenja veličine kapljica i PDI, dok je zeta-potencijal ostao gotovo

nepromijenjen. Slični rezultati dobiveni su i kod nanoemulzije pripravljene na mikrofluidizatoru s 9,8 % (*m/m*) oktadekana i 0,2 % (*m/m*) metilnolata kao uljne faze te 4 % (*m/m*) natrijevog laurilsulfata kao površinske aktivne tvari (123). Postupnim povećanjem tlaka s približno 100 na 1400 bara te broja ciklusa s 1 na 5 došlo je do smanjenja veličine kapljica s oko 400 na oko 60 nm, a smanjila se i raspodjela veličina kapljica navedene nanoemulzije. Ipak, u ovom doktorskom radu nije uočeno daljnje smanjenje veličine kapljica i PDI kada je tlak povećan s 1000 na 1300 bara, stoga je kao optimalni tlak izabran tlak od 1000 bara. Pri odabranom je tlaku lako uočljivo smanjenje veličine kapljica i PDI kada je broj ciklusa povećan s 1 na 3, dok daljnje povećanje broja ciklusa nije imalo velik utjecaj na navedene parametre. Iako se povećanjem broja ciklusa s 3 na 5 veličina kapljica smanjila za samo 3,6 nm, sve su sljedeće nanoemulzije pripravljene pri 1000 bara i 5 ciklusa kako bi se osigurala optimalna obrada formulacija, odnosno kako bi se postiglo najveće moguće smanjenje veličine kapljica i PDI.



Slika 13. a) veličina kapljica, b) PDI i c) zeta-potencijal nanoemulzija (Miglyol® 812 5 % (*m/m*), lecitin 0,1 % (*m/m*), Kolliphor® EL 0,5 % (*m/m*), pročišćena voda do 100 % (*m/m*)) pripremljenih na mikrofluidizatoru primjenom različitih tlakova (400-1300 bara) i broja ciklusa (1-15) s ciljem optimizacije procesnih parametara. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$).

Slikom 14 grafički je prikazana usporedba veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala nanoemulzija istog sastava pripremljenih na mikrofluidizatoru i visokotlačnom homogenizatoru pri 1000 bara i 5 ciklusa. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti da nema bitne razlike u veličini kapljica, PDI i zeta-potencijalu pripremljenih nanoemulzija, što znači da je pripremu nanoemulzije moguće provesti i na drugom tipu uređaja sličnog principa rada.



Slika 14. Usporedba a) veličine kapljica, b) PDI i c) zeta-potencijala nanoemulzija istog sastava (Miglyol® 812 5 % (*m/m*), lecitin 0,1 % (*m/m*), Kolliphor® EL 0,5 % (*m/m*), pročišćena voda do 100 % (*m/m*)) pripremljenih uz jednake procesne parametre (1000 bara, 5 ciklusa) na mikrofluidizatoru (MF) i visokotlačnom homogenizatoru (VTH). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 2$).

4.2.3. Priprava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

Uobičajeni postupak priprave sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom provodi se dodatkom otopine kitozana u gotovu primarnu anionsku nanoemulziju (61). Time se uvodi dodatan korak koji povećava složenost postupka priprave te mogućnost pogreške i kontaminacije, što smanjuje prikladnost postupka za uvećanje na industrijsko mjerilo. Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom, s uklopljenim indometacinom (0,05 %, *m/V*) namijenjene za oftalmičku primjenu pripravljene su uobičajenim postupkom (142). U gotovu primarnu anionsku nanoemulziju s 10 % (*m/V*) ricinusovog ulja, 8 % (*m/V*) Tween[®]-a 80, 4,4 % (*m/V*) glicerola i 0,1 % (*m/V*) natrijevog acetata, pripravljenu visokotlačnom homogenizacijom, dodana je otopina kitozana (1,5 %, *m/m*) u omjeru 1:1 (*V/V*). Dobivena je formulacija veličine kapljica 117,6 nm i zeta-potencijala 27,7 mV. Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom s uklopljenim kurkuminom pripravljene su dodatkom 1 %-tne (*m/m*) otopine oligokitozana (3 kDa, stupanj deacetilacije 90 %) te kitozana srednje (30 kDa, stupanj deacetilacije 89 %) ili velike (190-310 kDa, stupanj deacetilacije 85 %) molekulske mase u omjeru 1:1 (*V/V*) u gotovu anionsku nanoemulziju (veličina kapljica 113,93 nm, PDI 0,23, zeta-potencijal -36,23 mV) s 10 % (*m/m*) triglicerida srednje duljine lanaca, 6 % (*m/m*) lecitina iz sjemena soje i 4 % (*m/m*) Tween[®]-a 80, pripravljenu ultrasonikacijom (143). Radi smanjenja veličine kapljica i razbijanja nastalih aglomerata nanoemulzije su nakon dodatka kitozana ponovno podvrgnute ultrasonikaciji. Konačne formulacije imale su veličinu kapljica 97,65, 103,57 i 125,83 nm, PDI 0,2, 0,29 i 0,3 te zeta-potencijal 4,32, 39,94 i 33,4 mV. S druge strane, sekundarna kationska nanoemulzija s kitozanom male molekulske mase, s uklopljenim timololmaleatom (0,043 %, *m/m*) namijenjena za liječenje glaukoma pripravljena je tako da je otopina kitozana dodana u vodenu fazu prije miješanja uljne i vodene faze te obrade formulacije na visokotlačnom homogenizatoru (144). Nanoemulzija konačnog sastava: kitozan 0,5 % (*m/m*), izopropilmiristat 5 % (*m/m*), lecitin Lipoid E 80 1 % (*m/m*), Tween[®] 80 1,5 % (*m/m*), EDTA 0,1 % (*m/m*), BAK 0,02 % (*m/m*), glicerol 2,5 % (*m/m*) i pročišćena voda do 100 % (*m/m*) imala je veličinu kapljica 73,5 nm i zeta-potencijal 18,25 mV. Na isti način pripravljena je i sekundarna kationska nanoemulzija s 0,5 % (*m/m*) kitozana (410 kDa, stupanj deacetilacije 92 %), smjesom ricinusovog ulja i triglicerida srednje duljine lanaca (1:1) koja je tvorila uljnu fazu (u radu nije naveden udio uljne faze) i 2,5 % (*m/m*) Pluronic[®]-a F68, namijenjena za oftalmičku ili parenteralnu primjenu (47). Veličina kapljica navedene nanoemulzije iznosila je 124,1 nm, a zeta-potencijal 22,8 mV. S obzirom na dosadašnje rezultate, u sklopu ovog doktorskog rada ispitan je utjecaj molekulske mase i udjela kitozana te metode priprave na konačna svojstva

nanoemulzija. U gotovu anionsku nanoemulziju najprije su dodane različite količine otopine kitozana (1 %, *m/m*) male ili srednje molekulske mase. Dodatkom različitih količina otopine kitozana u formulaciju došlo je do različitog smanjenja udjela ulja i površinski aktivnih tvari. Udio ulja i površinski aktivnih tvari je, stoga, prilagođen na 2,5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, 0,05 % (*m/m*) lecitina i 0,25 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL dodatkom pročišćene vode (ako je bilo potrebno) kako bi se u svim formulacijama osigurala jednaka ukupna površina uljnih kapljica raspoloživa za oblaganje kitozanom. Konačni udio kitozana (male i srednje molekulske mase) iznosio je 0,05-0,5 % (*m/m*) te su tako pripremljenim nanoemulzijama izmjereni veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal (tablica 7). Obrat zeta-potencijala iz negativnog u pozitivni dokaz je elektrostatski posredovane interakcije negativno nabijenih kapljica i pozitivno nabijenih molekula kitozana te smještanja molekula kitozana na površinu kapljica. Nanoemulzije pripravljene dodatkom kitozana male molekulske mase manje su veličine kapljica i PDI od nanoemulzija pripravljenih dodatkom kitozana srednje molekulske mase. Navedena su zapažanja u skladu s rezultatima dobivenim nakon pripreme spomenutih nanoemulzija s kurkuminom, kod kojih je dodatak kitozana rastuće molekulske mase (3 – 190-310 kDa) doveo do porasta veličine kapljica s 97,65 na 125,83 nm (143). Porast veličine kapljica moguće je objasniti nastajanjem debljeg sloja kitozana oko kapljica dodatkom kitozana veće molekulske mase. Molekulska masa kitozana nije pokazala bitan utjecaj na zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija. Iako je kod spomenutih nanoemulzija s kurkuminom zeta-potencijal bio značajno manji nakon dodatka oligokitozana (3 kDa) nego nakon dodatka kitozana srednje (30 kDa) odnosno velike (190-310 kDa) molekulske mase u formulaciju, taj se rezultat pripisuje boljoj interakciji pozitivno nabijenih skupina oligokitozana s negativno nabijenom površinom uljnih kapljica i posljedičnom smanjenju broja slobodnih pozitivno nabijenih skupina oligokitozana na površini kapljica. S druge strane, slične vrijednosti zeta-potencijala (39,94 i 33,4 mV) nanoemulzija s kurkuminom postignute su nakon dodatka jednake količine kitozana srednje i velike molekulske mase, gotovo podjednakog stupnja deacetilacije. U drugom istraživanju, u kojem je ispitan utjecaj molekulske mase kitozana na zeta-potencijal sekundarnih kationskih nanoemulzija, nakon dodatka otopine kitozana molekulske mase 120 ± 70 odnosno 200 ± 110 kDa (stupanj deacetilacije 75-85 %) u primarnu anionsku nanoemulziju s uljem kukuruza i natrijevim laurilsulfatom (zeta-potencijal oko -50 mV), pri čemu je konačni udio kitozana u formulacijama iznosio 0,05-1 % (*m/m*), zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija iznosio je oko 50 mV, bez obzira na molekulsku masu i udio kitozana (145). Kitozani gotovo istih molekulskih masa i istog stupnja deacetilacije korišteni su za pripremu sekundarnih kationskih nanoemulzija u okviru ovog doktorskog rada, što može objasniti podudaranje

dobivenih rezultata. Postizanje većih vrijednosti zeta-potencijala u spomenutom istraživanju (145) već pri manjim udjelima kitozana vjerojatno je posljedica negativnijeg zeta-potencijala primarne anionske nanoemulzije s natrijevim laurilsulfatom te bržeg zasićenja površine kapljica molekulama kitozana.

Tablica 7. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija pripremljenih s 2,5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, 0,05 % (*m/m*) lecitina, 0,25 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL, rastućim udjelima kitozana male (MM_r) i srednje molekulske mase (SM_r) i pročišćenom vodom do 100 % (*m/m*).

Kitozan (%, <i>m/m</i>)	MM_r			SM_r		
	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta- potencijal (mV)	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta- potencijal (mV)
0,05	199,6±1,6	0,072±0,002	29,2±0,2	255,9±44,7	0,240±0,066	31,8±1,3
0,1	199,3±4,5	0,138±0,052	32,7±0,1	282,6±9,6	0,305±0,003	35,3±1,0
0,2	279,0±28,4	0,288±0,001	37,4±0,0	418,7±139,3	0,652±0,039	38,9±1,6
0,3	360,9±14,7	0,489±0,013	40,3±0,9	583,7±36,1*	0,841±0,023	41,4±2,4
0,4	390,1±27,4	0,504±0,014	39,0±0,5	626,8±74,3*	0,853±0,065	42,2±2,2
0,5	325,7±15,0	0,535±0,070	42,7±1,6	749,4±27,7*	0,791±0,175	44,0±2,0

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

*Zbog PDI > 0,7 moguće je da rezultati ne predstavljaju stvarnu srednju vrijednost

Za daljnja ispitivanja izabrane su formulacije s manjim (0,05 %, *m/m*) i većim (0,3 %, *m/m*) udjelom kitozana male molekulske mase te je ispitan utjecaj metode pripreme na njihova konačna svojstva. Formulacije istog sastava pripravljene su dodatkom kitozana u vodenu fazu na samom početku pripreme, prije miješanja uljne i vodene faze te obrade na visokoturažnoj miješalici i mikrofluidizatoru. U tablici 8 prikazana je usporedba veličina kapljica, PDI i zeta-potencijala sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom pripremljenih dvjema različitim metodama. Dodatkom kitozana u vodenu fazu na samom početku pripreme dobivena je manja veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija nego kada su one pripravljene dodatkom kitozana u gotovu anionsku nanoemulziju. Mogući razlog je umetanje molekula kitozana između molekula površinski aktivnih tvari na površini uljnih kapljica tijekom nastajanja

nanoemulzije te stvaranje miješanog sloja na granici faza čiji je ukupni naboj pozitivan (47). Kako je kitozan polimer prirodnog porijekla, u komercijalno dostupnim kitozanim prisutni su polimeri različitih molekulskih masa, stoga se za određeni kitozan ne navodi točno određena molekulska masa, već njihov raspon (146). Iz tog je razloga PDI nanoemulzija pripremljenih s većim udjelima kitozana očekivano veći. Zbog manje veličine kapljica i PDI te još uvijek dovoljno pozitivnog zeta-potencijala, sekundarne kationske nanoemulzije s 0,05 (NC1) i 0,3 (NC2) % (*m/m*) kitozana male molekulske mase pripravljene dodatkom kitozana u vodenu fazu na samom početku pripreme izabrane su za nastavak istraživanja.

Tablica 8. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija (Miglyol[®] 812 2,5 % (*m/m*), lecitin 0,05 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 0,25 % (*m/m*), pročišćena voda do 100 % (*m/m*)) s 0,05 ili 0,3 % (*m/m*) kitozana male molekulske mase pripremljenih dvjema različitim metodama.

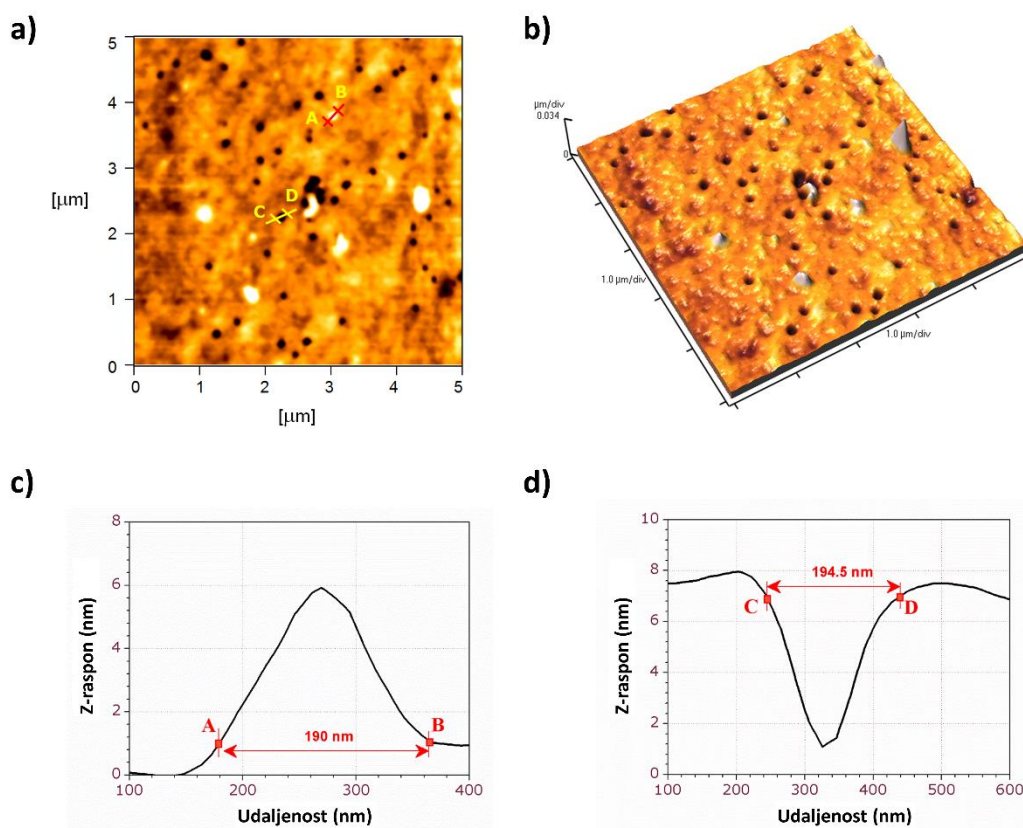
Kitozan dodan na kraju pripreme				Kitozan dodan na početku pripreme		
Kitozan (%, <i>m/m</i>)	Veličina kapljica	PDI	Zeta- potencijal (mV)	Veličina kapljica	PDI	Zeta- potencijal (mV)
0,05	199,6±1,6	0,072±0,002	29,2±0,2	179,3±2,3	0,061±0,015	18,7±1,9
0,3	360,9±14,7	0,489±0,013	40,3±0,9	179,3±7,6	0,169±0,011	30,0±1,5

Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2$)

4.2.4. Morfološka karakterizacija sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

Iako je dinamičko raspršivanje svjetlosti najčešće korištena tehnika za analizu raspodjele veličina kapljica nanoemulzija, ona ne pruža potpuni uvid u unutarnju strukturu nanoemulzija te katkad ne omogućuje detekciju manje populacije većih kapljica ili nakupina kapljica. Također, kod analize prosječne veličine kapljica dinamičkim raspršivanjem svjetlosti pretpostavlja se da su kapljice savršeno sferičnog oblika, što nije uvijek točno te može dovesti do netočnih rezultata (87). Za preciznu vizualizaciju unutarnje strukture te oblika i veličine kapljica nanoemulzija uspješno se koriste mikroskopske tehnike, poput AFM (147, 148). Morfološka analiza sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom provedena je AFM metodom kako bi se potvrdili rezultati dobiveni dinamičkim raspršivanjem svjetlosti. Reprezentativni rezultati morfološke analize formulacije NC2 prikazani slikom 15 pokazuju

sferične kapljice, čija se veličina podudara s rezultatima dobivenim dinamičkim raspršivanjem svjetlosti.



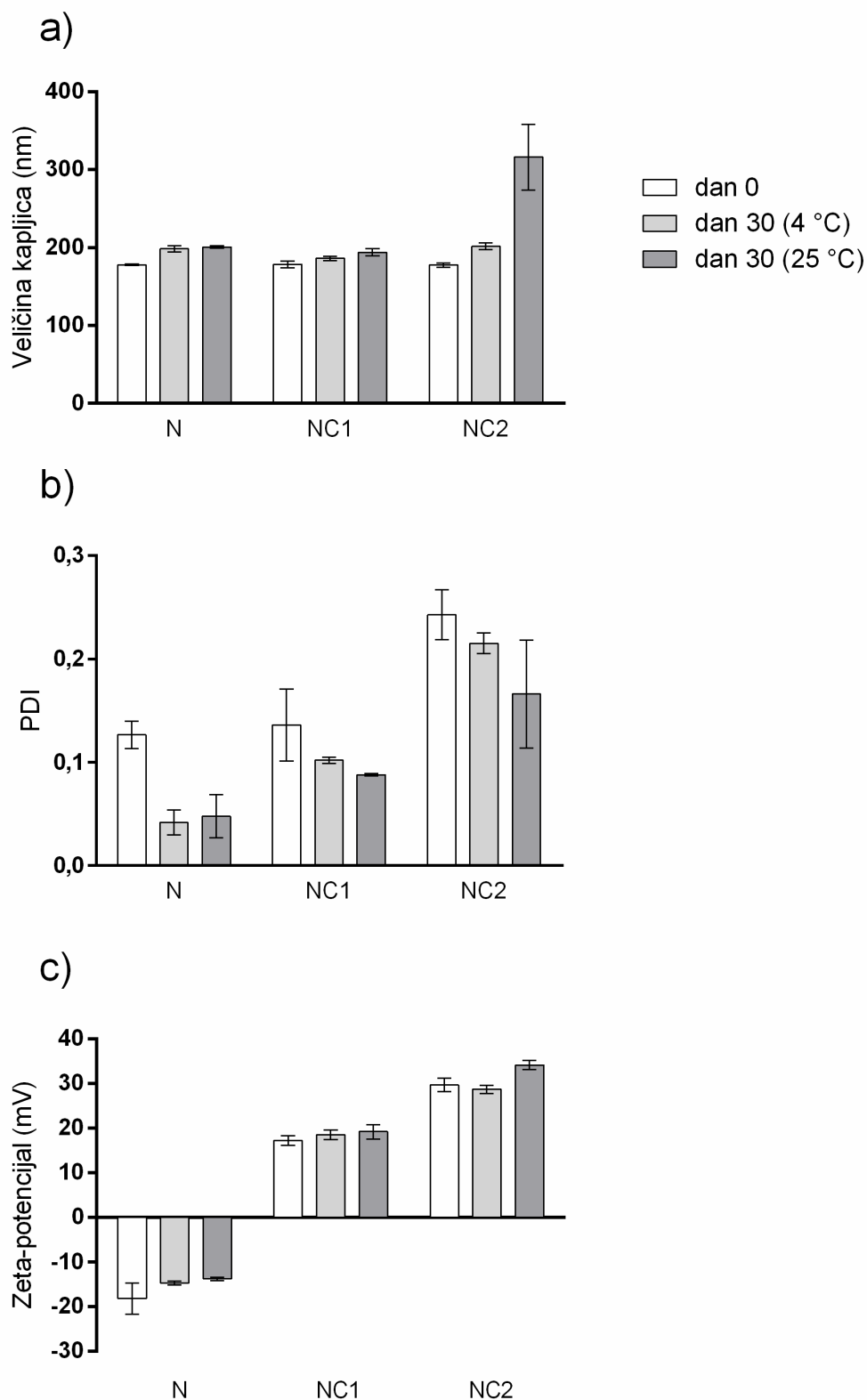
Slika 15. Rezultati analize formulacije NC2 (Miglyol[®] 812 2,5 % (*m/m*), lecitin 0,05 % (*m/m*), Kolliphor[®] EL 0,25 % (*m/m*), kitozan male molekulske mase 0,3 % (*m/m*), pročišćena voda do 100 % (*m/m*)) dobiveni metodom mikroskopije atomskih sili: a) 2D topografija (5 × 5 μm pretražna površina), b) 3D topografija (5 × 5 μm pretražna površina), c) i d) profili dviju reprezentativnih kapljica označenih na topografiji a).

4.2.5. Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

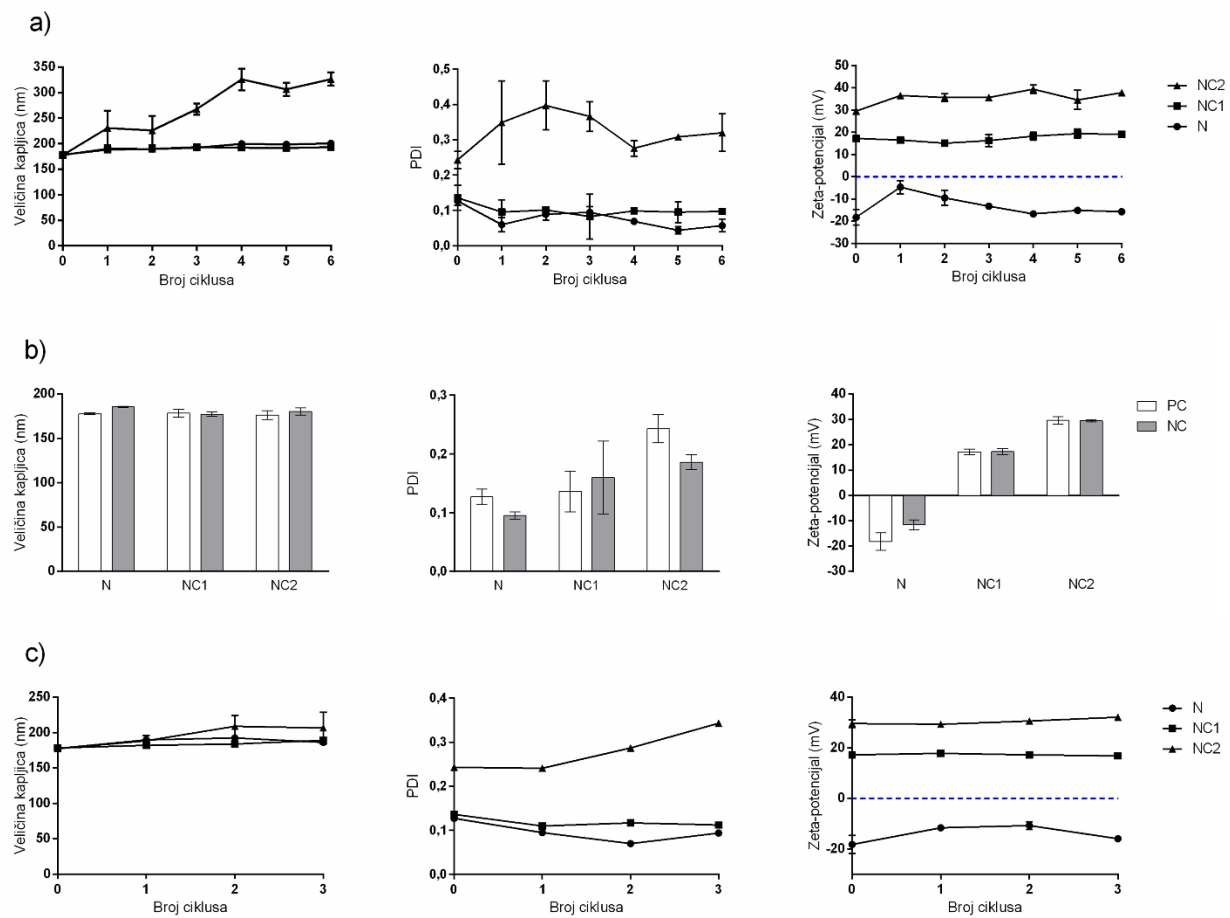
Korištenje dviju različitih površinski aktivnih tvari (lecitina i Kolliphor[®]-a EL) u pripravi formulacija NC1 i NC2 omogućilo je nastajanje fleksibilnog sloja na granici faza pojačanih steričkih stabilizirajućih svojstava. Dodatak kitozana omogućio je porast apsolutne vrijednosti zeta-potencijala, što je pridonijelo elektrostatskoj stabilizaciji sustava, a poznato je i da oblaganje površine kapljica nanoemulzija kitozanom može usporiti njihov rast difuzijskim procesom Ostwaldovog zrenja (60). S druge strane, dodatak kitozana u premalom ili prevelikom udjelu može narušiti stabilnost nanoemulzija i potaknuti flokulaciju kapljica

mehanizmom premošćivanja (engl. *bridging flocculation*) ili iscrpljivanja (engl. *depletion flocculation*) (59, 60). Stabilnost formulacija NC1 i NC2 te kontrolne formulacije bez kitozana (N) ispitana je pohranom 30 dana pri 4 i 25 °C te stres testovima, nakon čega su nanoemulzije vizualno pregledane te im je izmjerena veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal. Nakon 30 dana pohrane izgled nanoemulzija ostao je nepromijenjen, odnosno nije došlo do vrhnjenja ni razdvajanja faza. Primijećen je pad PDI kod sve 3 formulacije, dok se zeta-potencijal nije bitno promijenio, osim kod formulacije NC2 pohranjene pri 25 °C, kod koje je došlo do blagog porasta zeta-potencijala (slika 16). Kod formulacija NC1 i N nije uočen bitan porast veličine kapljica nakon pohrane, dok je kod formulacije NC2 veličina kapljica porasla na oko 315 nm nakon 30 dana pohrane pri 25 °C.

Otpornost nanoemulzija na promjene u temperaturi tijekom pohrane ispitana je stres testovima koji su uključivali cikluse zagrijavanja i hlađenja te cikluse zamrzavanja i odmrzavanja, pri čemu su nakon svakog ciklusa nanoemulzijama izmjereni veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal (slika 17). Iako su nakon svih 6 ciklusa zagrijavanja i hlađenja nanoemulzije ostale vizualno nepromijenjene, kod formulacije NC2 uočen je porast veličine kapljica (oko 1,6 ×), uz odstupanja od početnog PDI tijekom ciklusa. Formulacije NC1 i N nisu pokazale bitne promjene u veličini kapljica i PDI, a zeta-potencijal je ostao relativno nepromijenjen kod sve 3 formulacije. Nakon 3 ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja izgled, veličina kapljica i zeta-potencijal nisu se značajno promijenili kod niti jedne formulacije, dok je kod formulacije NC2 primijećen porast PDI. Formulacije su u konačnici centrifugirane 30 minuta pri 9000 × g kako bi se ispitala njihova kinetička stabilnost, odnosno otpornost na vrhnjenje, taloženje ili bilo koji drugi način razdvajanja faza. Vizualnim pregledom nanoemulzija nakon centrifugiranja primijećeno je reverzibilno vrhnjenje te su nakon samo blagog potresanja sve 3 formulacije poprimile homogen mliječno bijeli izgled, kakav su imale i prije centrifugiranja. Kinetička stabilnost formulacija potvrđena je i mjerenjima veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala. Uzimajući u obzir sve provedene testove, formulacija NC1 pokazala se stabilnijom od formulacije NC2. Ipak, kako se fizičko-kemijska svojstva formulacije NC2 nakon 30 dana pohrane pri 4 °C nisu bitno promijenila te kako je ista formulacija također pokazala izuzetnu kinetičku stabilnost, obje su formulacije uključene u daljnja ispitivanja.



Slika 16. a) veličina kapljica, b) PDI i c) zeta-potencijal nanoemulzija N (bez kitozana), NC1 (0,05 %, *m/m* kitozana) i NC2 (0,3 %, *m/m* kitozana) izmjereni na dan pripreve (dan 0) te nakon 30 dana pohrane pri 4 °C (dan 30 (4 °C)) odnosno 25 °C (dan 30 (25 °C)). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2-3$).



Slika 17. Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija N (bez kitozana), NC1 (0,05 %, *m/m* kitozana) i NC2 (0,3 %, *m/m* kitozana) na dan pripreve te nakon provedenih stres testova (a) ciklusi zagrijavanja i hlađenja, b) centrifugiranje (PC = prije centrifugiranja, NC = nakon centrifugiranja), c) ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 2-3$)

4.2.6. Uklapanje ibuprofena u sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom

U oftalmičkim formulacijama udio ibuprofena iznosi 0,1-0,2 % (149–151). Ibuprofen je, stoga, uklopljen u formulacije NC1, NC2 te kontrolnu formulaciju N u udjelu 0,2 % (*m/m*), tako da je otopljen u uljnoj fazi pri sobnoj temperaturi neposredno prije miješanja uljne i vodene faze. Osmolarnost formulacija prilagođena je primijeni na oko dodatkom glicerola (2,5 %, *m/m*) u vodenu fazu, koji je, kao i kod primarnih kationskih nanoemulzija sa stearilaminom, izabran zbog neutralnog naboja i kratkotrajnog osmoprotektivnog učinka (17, 127). Konačni sastav pripremljenih nanoemulzija prikazan je u tablici 9. Tako pripremljenim nanoemulzijama određena je učinkovitost uklapanja ibuprofena te veličina kapljica, PDI, zeta-potencijal, pH, površinska napetost i viskoznost (tablica 10). Veličina kapljica, PDI, zeta-potencijal, pH, površinska napetost i viskoznost izmjereni su i nanoemulzijama bez uklopljene djelatne tvari.

Tablica 9. Konačni sastav pripremljenih nanoemulzija.

Formulacija	Ibuprofen (%, <i>m/m</i>)	Kitozan (%, <i>m/m</i>)	Miglyol® 812 (%, <i>m/m</i>)	Lecitin (%, <i>m/m</i>)	Kolliphor® EL (%, <i>m/m</i>)	Glicerol (%, <i>m/m</i>)	Voda (%, <i>m/m</i>)
N	-	-	2,5	0,05	0,25	2,5	94,7
IN	0,2	-	2,5	0,05	0,25	2,5	94,5
NC1	-	0,05	2,5	0,05	0,25	2,5	94,65
INC1	0,2	0,05	2,5	0,05	0,25	2,5	94,45
NC2	-	0,3	2,5	0,05	0,25	2,5	94,4
INC2	0,2	0,3	2,5	0,05	0,25	2,5	94,2

Uklapanje djelatne tvari može značajno utjecati na fizičko-kemijska svojstva formulacije zbog složenosti interakcija djelatne tvari s različitim fazama nanoemulzije (51). Nakon uklapanja ibuprofena veličina kapljica i PDI pripremljenih nanoemulzija ostali su relativno nepromijenjeni. Ipak, uklapanje ibuprofena uzrokovalo je porast zeta-potencijala kod formulacija s kitozanom.

Učinkovitost uklapanja ibuprofena kod svih je formulacija veća od 98 %. Ovako velika učinkovitost uklapanja očekivana je s obzirom na lipofilni karakter i dobru topljivost ibuprofena u odabranoj uljnoj fazi.

Izmjereni pH svih formulacija s kitozonom približno je 4,4. Uzrok tome je priprava vodene otopine kitozana uz neizbježan dodatak octene kiseline radi osiguranja topljivosti kitozana. Oko može tolerirati pripravke širokog raspona pH, posebice kada pripravci nisu puferirani jer se tada, zahvaljujući puferском kapacitetu suza, pH vrijednost suznog filma brzo vraća na svoje fiziološke vrijednosti (17, 66, 78). Primjena oftalmičkog pripravka niskog pH neće nužno uzrokovati osjećaj peckanja i nelagode ako se pH suznog filma može dovoljno brzo vratiti na svoje fiziološke vrijednosti (78, 152). Ispitivanje na 6 zdravih dobrovoljaca pokazalo je da je neposredno nakon primjene 20 μ L fosfatno puferirane otopine soli (0,067 M) pH 5,5 na oko izmjerena pH vrijednost suznog filma iznosila 6,0-6,5, a samo 1 minutu nakon primjene 7 te se u sljedećih 1-1,5 minuta vratila na fiziološke vrijednosti (153). Podaci o puferском kapacitetu suza oboljelih od suhog oka nedostaju, no primijećen je pomak pH suznog filma prema višim vrijednostima (154, 155). Iako je kod bolesti suhog oka volumen suznog filma najčešće smanjen, pomak pH suznog filma prema lužnatijim vrijednostima mogao bi djelovati kao kompenzacijski mehanizam koji bi omogućio povrat pH suznog filma na fiziološke vrijednosti nakon primjene pripravka nižeg pH, poput sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada.

Površinska napetost utječe na širenje formulacije i moćenje površine oka te kapilarnu drenažu formulacije kroz nazolakrimalni kanal, što posljedično utječe na vrijeme zadržavanja formulacije na mjestu primjene (85). Mjerenja površinske napetosti rađena su pri 25 °C kako bi dobivene vrijednosti bile usporedive s literaturnim vrijednostima površinske napetosti suznog filma, koje su također dobivene mjerenjem pri 25 °C. Rezultati prikazani u tablici 10 pokazuju da dodatak kitozana u formulaciju uzrokuje smanjenje površinske napetosti, što se može pripisati površinski aktivnim svojstvima kitozana, koji se i sam može koristiti za stabilizaciju emulzija tipa U/V (156). Uklapanje ibuprofena dodatno smanjuje površinsku napetost formulacija. Površinski aktivna svojstva ibuprofena također su poznata (157, 158) te su, kao i kod kitozana, najvjerojatnije odgovorna za smanjenje površinske napetosti pripremljenih formulacija. Površinska napetost oftalmičkih formulacija ne bi trebala biti manja od 35 mN m^{-1} jer tada njihova primjena može izazvati osjećaj boli i nelagode (92). Površinska napetost formulacije INC2 na samoj je granici prihvatljivosti ($34,5 \pm 0,2 \text{ mN m}^{-1}$). Ipak, s obzirom na to da su kod bolesti suhog oka izmjerene povećane vrijednosti površinske napetosti

suznog filma (5), potrebna su dodatna ispitivanja kojima bi se utvrdilo izaziva li doista primjena formulacije INC2 bolne i neugodne osjećaje na oku.

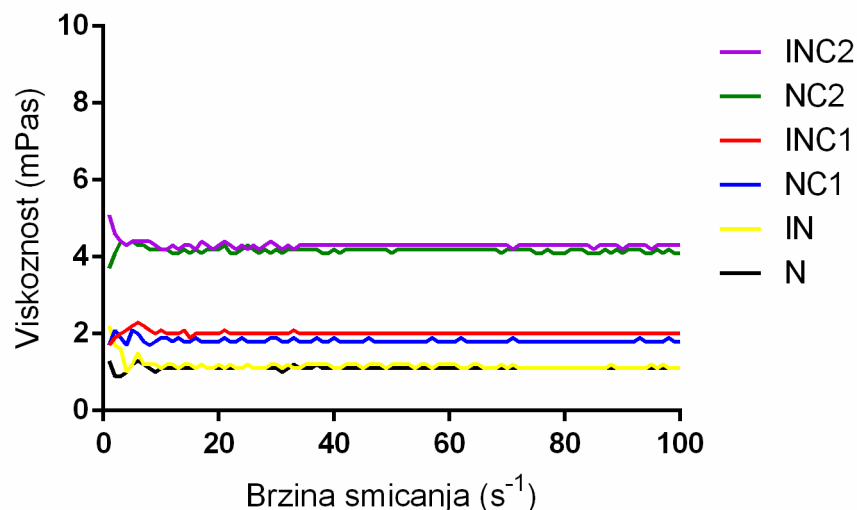
Reološka ispitivanja pokazala su da se pripravljene nanoemulzije ponašaju kao Newtonovi sustavi (slika 18) te da dodatak kitozana povećava viskoznost formulacija. Viskoznost pripremljenih nanoemulzija (1,1-4,1 mPas) je unutar fiziološkog raspona viskoznosti suznog filma (1-9 mPas), što ih čini prikladnima za primjenu na oko. Osim toga, mala viskoznost formulacija omogućuje veću točnost doziranja kada se primjenjuju na oko pomoću bočice s ugrađenom kapaljkom.

Osmolarnost pripremljenih nanoemulzija je unutar fiziološkog raspona osmolarnosti suznog filma (270-315 mOsm kg⁻¹) (5). Kratkotrajani osmoprotektivni učinak glicerola, korištenog za izotonizaciju formulacija, mogao bi imati povoljan učinak na epitelne stanice rožnice i spojnice oka štiteći ih od hiperosmotskog stresa kod bolesti suhog oka (15, 127).

Tablica 10. Veličina kapljica, PDI, zeta-potencijal, učinkovitost uklapanja ibuprofena, pH, viskoznost, osmolarnost i površinska napetost pripremljenih nanoemulzija bez kitozana (IN), s 0,05 % (*m/m*) kitozana (INC1) i s 0,3 % (*m/m*) kitozana (INC2).

Formulacija	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)	Učinkovitost uklapanja (%)	pH	Viskoznost (mPas)	Osmolarnost (mOsm kg ⁻¹)	Površinska napetost (mN m ⁻¹)
IN	172,5±0,4 (177,8±1,1)	0,116±0,017 (0,127±0,013)	-15,6±0,2 (-18,2±3,5)	98,24±0,10	4,42±0,04 (5,83±0,05)	1,1±0 (1,1±0,1)	271,0±18,5 (275,5±15,6)	38,9±0,7 (42,4±0,5)
INC1	175,1±1,1 (183,9±1,2)	0,127±0,013 (0,114±0,006)	24,6±0,4 (18,0±1,7)	98,73±0,03	4,41±0,03 (4,49±0,01)	1,9±0,1 (1,8±0)	300,3±1,0 (298,5±1,3)	35,7±0,3 (38,0±0,7)
INC2	192,4±28,9 (177,4±2,6)	0,295±0,120 (0,243±0,024)	36,8±2,0 (29,6±1,5)	98,86±0,01	4,42±0,01 (4,39±0,05)	4,1±0,4 (4,0±0,2)	291,5±20,2 (316,5±1,7)	34,5±0,2 (39,4±0,4)

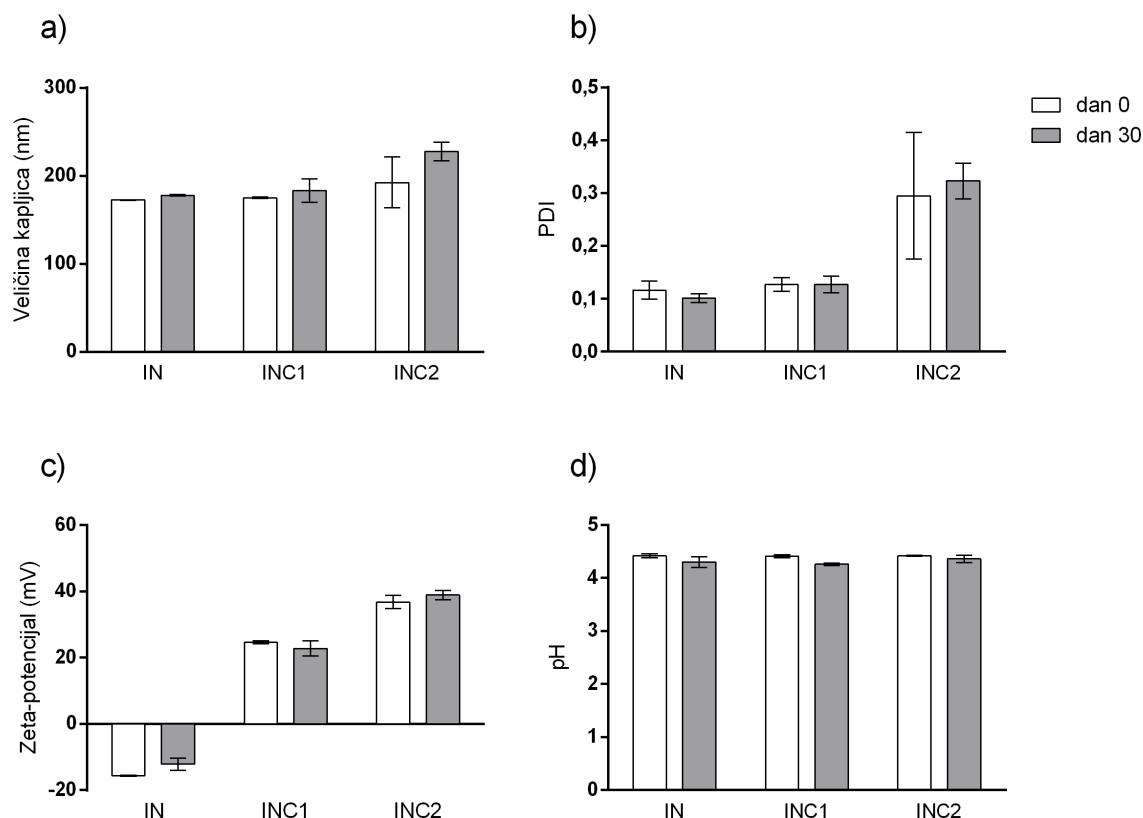
Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n \geq 3$)
 Vrijednosti u zagradama odnose se na nanoemulzije bez uklopljenog ibuprofena



Slika 18. Krivulje viskoznosti pripravljenih nanoemulzija bez kitozana s uklopljenim ibuprofenom (IN) i bez ibuprofena (N), s 0,05 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC1) i bez ibuprofena (NC1) te s 0,3 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC2) i bez ibuprofena (NC2).

4.2.7. Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozansom s uklopljenim ibuprofenom

Osim na fizičko-kemijska svojstva, uklapanje djelatne tvari može utjecati i na stabilnost nanoemulzija. Ipak, prema dosadašnjim saznanjima još uvijek nije moguće predvidjeti konkretan učinak na stabilnost na temelju fizičko-kemijskih svojstava djelatne tvari (51). Stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozansom s uklopljenim ibuprofenom ispitana je nakon 30 dana pohrane pri 4 °C mjerenjem veličine kapljica, PDI, zeta-potencijala i pH (slika 19). Veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal formulacija IN i INC1 ostali su gotovo nepromijenjeni. Kod formulacije INC2 primijećen je porast veličine kapljica za oko 35 nm, dok se PDI i zeta-potencijal nisu bitno promijenili. Kod sve 3 formulacije pH se nije bitno promijenio. Formulacija INC1 je, kao i prije uklapanja ibuprofena, pokazala bolju stabilnost od formulacije INC2 s većim udjelom kitozana, što ukazuje na to da dodatak ibuprofena nije imao velik utjecaj na stabilnost pripravljenih formulacija.



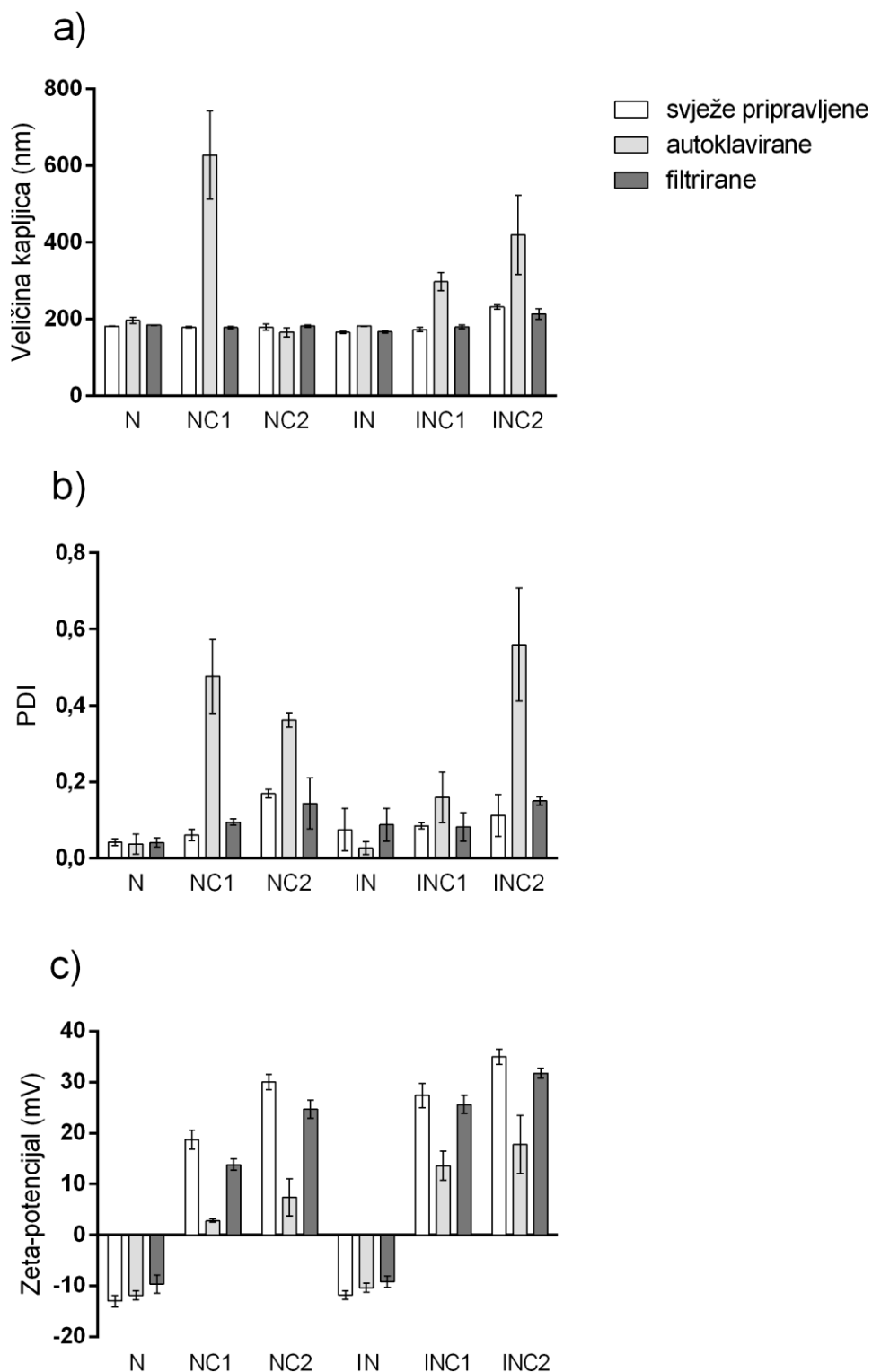
Slika 19. a) veličina kapljica, b) PDI, c) zeta-potencijal i d) pH nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom bez kitozana (IN), s 0,05 % (*m/m*) kitozana (INC1) i s 0,3 % (*m/m*) kitozana (INC2) izmjereni na dan pripreve te nakon 30 dana pohrane pri 4 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n \geq 3$).

4.2.8. Sterilizacija

Kako ne bi uzrokovali ozbiljne infekcije oka s mogućnošću trajnog oštećenja vida, svi oftalmički pripravci moraju biti sterilni (77, 78). Prema Europskoj farmakopeji, metoda izbora za sterilizaciju tekućih pripravaka na vodenoj osnovi je sterilizacija zasićenom vodenom parom pod tlakom (autoklaviranje), no u slučaju kada stabilnost pripravka to ne dopušta moguća je i bakteriološka filtracija. Za uspješnost autoklaviranja pripravak je potrebno izložiti najmanje 15 minuta temperaturi od najmanje 121 °C, dok je za bakteriološku filtraciju potrebno koristiti sterilne filtere čija veličina pora nije veća od 0,22 μm . Za pripravljene nanoemulzije je, stoga, ispitana mogućnost sterilizacije autoklaviranjem (121°C / 20 minuta) i bakteriološkom filtracijom (0,2 μm). Za sterilizaciju filtracijom korišteni su filteri od polietersulfona zbog toga

što su, prema uputi proizvođača, prikladni za uzorke na vodenoj osnovi male viskoznosti te su malog kapaciteta adsorpcije. Nakon svakog sterilizacijskog postupka izmjereni su veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal nanoemulzija, a rezultati su prikazani slikom 20. Dok su formulacije bez kitozana (N i IN) ostale stabilne nakon autoklaviranja, formulacije s kitozonom (NC1, NC2, INC1 i INC2) već su i vizualno izgledale drugačije. Osim izraženog vrhnjenja nanoemulzije su promijenile boju. Mjerenja su pokazala značajan porast veličine kapljica i PDI, uz smanjenje zeta-potencijala formulacija s kitozonom, što ukazuje na to da je autoklaviranje narušilo njihovu stabilnost. Moguće je da je izlaganjem sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom povišenoj temperaturi došlo do hidrolize triglicerida i fosfolipida iz uljne faze te do unakrsnog povezivanja lanaca kitozana preko amino skupina (159), što je narušilo njihovu stabilnost. Prethodno ispitivanje provedeno na sekundarnim kationskim nanoemulzijama s kitozonom pokazalo je slične rezultate (47). Nakon autoklaviranja (121 °C / 20 minuta) došlo je do razdvajanja faza nanoemulzija koje su se sastojale od ricinusovog ulja i triglicerida srednje duljine lanaca (1:1) kao uljne faze (u radu nije naveden udio uljne faze), sojinog lecitina Lipoid S 75 (1,5 %, *m/m*) kao površinski aktivne tvari, kitozana (0,5 %, *m/m*, 410 kDa, stupanj deacetilacije 92 %) i pročišćene vode (do 100 %, *m/m*). Kada je umjesto lecitina dodan Pluronic® F68 (2,5 %, *m/m*) pripravljene nanoemulzije ostale su stabilne nakon autoklaviranja. Autori smatraju da je razlog nestabilnosti interakcija pozitivno nabijenog kitozana s negativno nabijenim fosfolipidima iz lecitina i posljedično narušavanje integriteta sloja površinski aktivnih tvari na granici faza. Slično tome, razdvajanje faza nakon autoklaviranja (121 °C / 15 minuta) dogodilo se i kod nanoemulzije sastavljene od 0,5 % (*m/m*) kitozana male molekulske mase, 5 % (*m/m*) izopropilmiristata, 1 % (*m/m*) lecitina Lipoid E 80, 1,5 % (*m/m*) Tween®-a 80, 0,1 % (*m/m*) EDTA, 0,02 % (*m/m*) BAK-a, 2,5 % (*m/m*) glicerola i pročišćene vode do 100 % (*m/m*) (144). Ipak, navedena je nanoemulzija ostala stabilna nakon filtracije (0,22 µm). Veličina kapljica i PDI nanoemulzije prije filtracije iznosili su 81,2 nm i 0,131, a nakon filtracije 80,2 nm i 0,088. Bez značajnih promjena u veličini kapljica i PDI nakon filtracije (0,2 µm) ostala je i nanoemulzija s 3,9 % (*m/m*) Labrafac®-a kao uljne faze, 5,85 % (*m/m*) Kolliphor®-a HS15 i 9,75 % (*m/m*) Labrasol®-a kao površinski aktivnih tvari te 10 mM fosfatnim puferom (do 100 %, *m/m*) koji je tvorio vodenu fazu (80). Veličina kapljica i PDI nanoemulzije prije filtracije iznosili su 84,8 nm i 0,107, a nakon filtracije 81,9 nm i 0,124. Filtracija nije pokazala utjecaj ni na zeta-potencijal, pH ni osmolarnost nanoemulzije. Za razliku od autoklaviranja, filtracija nije narušila stabilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada, što je dokazano mjerenjem veličine kapljica, PDI i zeta-potencijala (slika 20), stoga je u ovom slučaju sterilizacija bakteriološkom filtracijom u sterilne

spremnike metoda izbora. Time se izbjegava potreba za aseptičkom pripravom nanoemulzija, što dodatno komplicira postupak i značajno povećava troškove priprave.



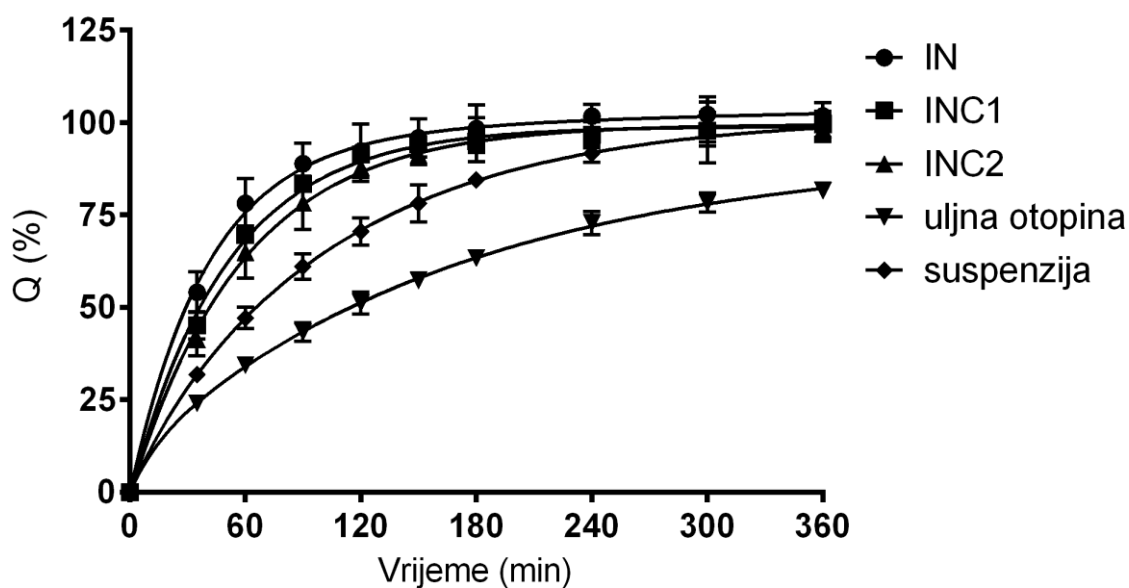
Slika 20. a) veličina kapljica, b) PDI i c) zeta-potencijal nanoemulzija bez kitozana s uklopljenim ibuprofenom (IN) i bez ibuprofena (N), s 0,05 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC1) i bez ibuprofena (NC1) te s 0,3 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC2) i bez ibuprofena (NC2) izmjereni na dan priprave te nakon autoklaviranja (121 °C / 20 minuta) odnosno filtracije (0,2 μm). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (*n* = 2).

4.2.9. Oslobađanje ibuprofena *in vitro*

Na brzinu oslobađanja djelatne tvari *in vitro* utječu razna fizičko-kemijska svojstva djelatne tvari, ali i same formulacije unutar koje je ona uklopljena, stoga se oslobađanje *in vitro* koristi kao standardna metoda za predviđanje učinka formulacije nakon primjene (84). Kako trenutno ne postoji standardna farmakopejska metoda za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz oftalmičkih pripravaka, za ispitivanje *in vitro* oslobađanja ibuprofena iz pripremljenih nanoemulzija odabrana je metoda s dijalizacijskom vrećicom, kao najčešće korištena metoda za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz oftalmičkih nanosustava (104). Veličina pora dijalizacijske vrećice (12-14 kDa) odabrana je kako bi omogućila difuziju ibuprofena te istovremeno spriječila difuziju kapljica nanoemulzija u okolni medij. Kako dijalizacijska vrećica pruža određeni otpor difuziji djelatne tvari, poželjno je utvrditi utjecaj dijalizacijske vrećice na brzinu oslobađanja korištenjem otopine djelatne tvari kao kontrole (104). Ipak, kako je koncentracija ibuprofena u pripremljenim nanoemulzijama $22 \times$ veća od topljivosti ibuprofena u vodi ($0,09 \text{ mg mL}^{-1}$) (160), korištenje vodene otopine ibuprofena kao kontrole nije bilo moguće, stoga su kao kontrolne formulacije korištene otopina ibuprofena u Miglyol[®]-u 812 i komercijalno dostupna oralna suspenzija ibuprofena (Neofen[®], Belupo). Volumen medija za oslobađanje (fosfatnog pufera) iznosio je 900 mL kako bi tijekom cijelog eksperimenta bili zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti. Iako je korišteni volumen višestruko puta veći od stvarnog volumena suznog filma, moguće je da bi i nakon primjene nanoemulzija na oko u suznom filmu bili zadovoljeni uvjeti osigurane topljivosti zbog apsorpcije ibuprofena u rožnicu i spojnicu oka te brzog uklanjanja ibuprofena dinamikom suza i neproduktivnom apsorpcijom u sistemsku cirkulaciju putem krvnih žila spojnice (32). Temperatura ($34 \text{ }^\circ\text{C}$) i pH medija za oslobađanje (7,4) prilagođeni su kako bi simulirali stvarne uvjete na površini oka (98), a miješanje (50 rpm) je uvedeno kako bi smanjilo utjecaj stacionarnog vodenog sloja na brzinu difuzije ibuprofena. Profili oslobađanja ibuprofena iz nanoemulzija i kontrolnih formulacija tijekom 6 sati (360 minuta) grafički su prikazani slikom 21. Unutar 120 minuta iz svih se nanoemulzija oslobodilo oko 90 % ibuprofena te za formulacije IN, INC1 i INC2 $t_{50\%}$ iznosi 30, 35 i 41 minutu. Oslobađanje ibuprofena iz nanoemulzija je statistički značajno brže u odnosu na oslobađanje ibuprofena iz suspenzije ($t_{50\%} = 68$ minuta, $f_2 < 45$) i uljne otopine ($t_{50\%} = 94$ minute, $f_2 < 30$). Dobivene rezultate moguće je objasniti velikom ukupnom površinom uljnih kapljica, koja je kod pripremljenih nanoemulzija na raspolaganju za difuziju ibuprofena u okolni medij. Uzimajući u obzir relativno kratko vrijeme zadržavanja oftalmičkih pripravaka na mjestu primjene, ovakav profil oslobađanja ibuprofena mogao bi imati pozitivne

učinke. Kada se međusobno usporede profili oslobađanja ibuprofena iz pripremljenih nanoemulzija, primjećuje se da dodatak kitozana u formulaciju blago usporava oslobađanje ibuprofena, no statistički značajna razlika utvrđena je samo između formulacija IN i INC2 ($f_2 = 48$). Slično tome, dodatak kitozana (0,25 %, m/V) u nanoemulziju s kapsaicinom (10 mM), Miglyol[®]-om 812 (3,125 %, V/V) i lecitinom (1 %, V/V) bitno je usporio oslobađanje kapsaicina (161). Nakon 12 sati oslobađanja, koje je ispitano metodom dijalize, iz nanoemulzije bez kitozana oslobodilo se oko 8 % kapsaicina, dok se iz nanoemulzije s kitozonom (autori formulaciju nazivaju nanokapsulama) oslobodilo samo 4 % kapsaicina. Autori smatraju da je za smanjenje brzine oslobađanja kapsaicina odgovorna polimerna ovojnica na površini kapljica, što bi moglo objasniti i smanjenje brzine oslobađanja ibuprofena iz sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozonom pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada.

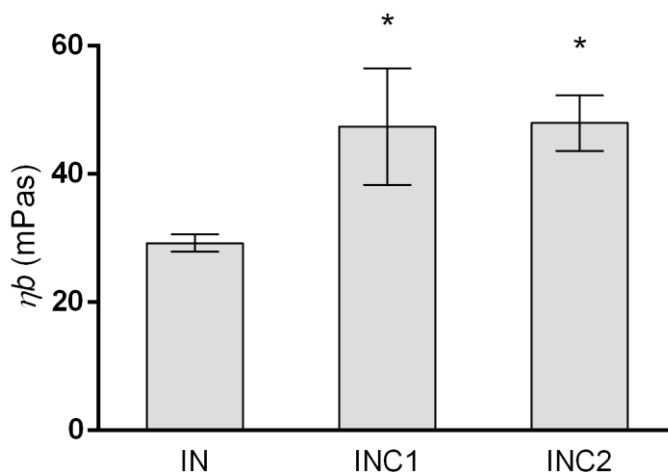
Kako bi se omogućila bolja usporedivost rezultata prikupljenih iz različitih istraživanja te zadovoljavajuća *in vitro* – *in vivo* korelacija, nužan je razvoj standardiziranih i biorelevantnih metoda za ispitivanje *in vitro* oslobađanja djelatnih tvari iz oftalmičkih pripravaka.



Slika 21. Profili *in vitro* oslobađanja ibuprofena iz nanoemulzija bez kitozana (IN), s 0,05 % (m/m) kitozana (INC1) i 0,3 % (m/m) kitozana (INC2) te otopine ibuprofena u Miglyol[®]-u 812 (uljna otopina) i komercijalno dostupne suspenzije ibuprofena (suspenzija) tijekom 6 sati (360 minuta) u fosfatnom puferu pH 7,4 pri 34 °C. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 3-6$).

4.2.10. Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

Reološke metode već se godinama koriste za ispitivanje mukoadhezivnosti polimera ili tekućih formulacija. Glavna pretpostavka tih metoda je da se nakon miješanja otopine polimera ili formulacije s mucinom događa ispreplitanje polimernih lanaca s lancima mucina, što se očituje kao reološka promjena i dokaz je mukoadhezivnih interakcija (106). Mehanizam mukoadhezivnog djelovanja kitozana uključuje elektrostatske interakcije, vodikove veze te hidrofobne interakcije s negativno nabijenim lancima mucina (130, 162), stoga se očekuje da su i pripravljene sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom mukoadhezivne. Mukoadhezivna svojstva pripremljenih nanoemulzija ispitana su rotacijskim testom pri kontroliranoj brzini smicanja, nakon miješanja s disperzijom mucina u STF-u pH 7,4. Pretpostavka korištene metode je da je viskoznost smjese mucina i ispitivane nanoemulzije rezultat doprinosa viskoznosti disperzije mucina, viskoznosti nanoemulzije te komponente koja proizlazi iz interakcije nanoemulzije i mucina (109). Taj sinergistički porast viskoznosti izražen je kao komponenta viskoznosti zbog bioadhezije (η_b), a rezultati su grafički prikazani slikom 22. Zanimljivo je da i sama kontrolna formulacija IN bez kitozana pokazuje određena mukoadhezivna svojstva te izračunata η_b iznosi čak 30 mPas. Formulacije INC1 i INC2 pokazuju statistički značajno veće vrijednosti η_b (INC1: $P = 0,0210$; INC2: $P = 0,0184$), koje u oba slučaja iznose oko 48 mPas, što je dokaz da se doista dogodila interakcija kitozana prisutnog na površini uljnih kapljica i lanaca mucina. Ipak, razlika u η_b između formulacija INC1 i INC2 nije se pokazala statistički značajnom ($P = 0,9927$), stoga je moguće zaključiti kako dodatak kitozana u većem udjelu (0,3 %, *m/m*) ne povećava mukoadhezivna svojstva formulacije.



Slika 22. Mukoadhezivna svojstva nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom bez kitozana (IN), s 0,05 % (*m/m*) kitozana (INC1) i s 0,3 % (*m/m*) kitozana (INC2) ispitana reološkom metodom pri kontroliranoj brzini smicanja nakon miješanja s disperzijom mucina (20 %, *m/m*) u STF-u pH 7,4. Mukoadhezivna svojstva nanoemulzija izražena su kao komponenta viskoznosti zbog bioadhezije (η_b). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n = 3$). *Razlikuje se od kontrolne formulacije IN ($P < 0,05$).

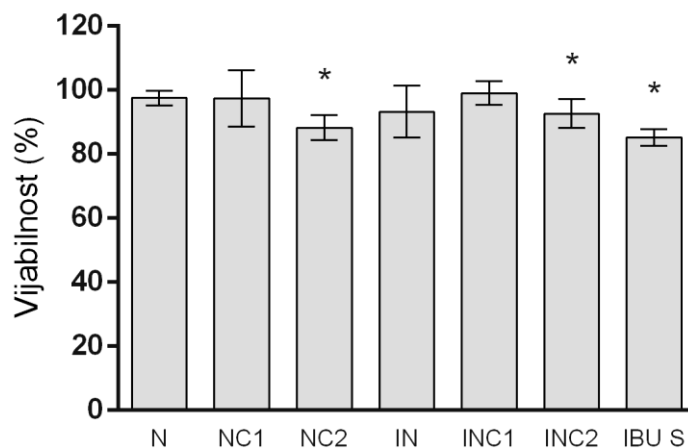
4.2.11. Ispitivanje biokompatibilnosti sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom

Iako je biokompatibilnost jedno od uvriježenih svojstava kitozana, primijećeni su njegovi toksični učinci ovisni o koncentraciji nakon inkubacije IOBA NHC spontano imortaliziranih stanica humanog epitela spojnice s kompleksnim nanosustavima za oftalmičku primjenu, pripremljenim kombinacijom liposoma i kitozanskih nanočestica (163). Nakon izlaganja konfluentnog monosloja stanica rastućim koncentracijama kompleksnih nanosustava ($0,25-1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) primijećeno je smanjenje vijabilnosti stanica proporcionalno koncentraciji na vrijednosti koje nisu bile manje od 70 %. Neionske površinski aktivne tvari također pokazuju o koncentraciji ovisne toksične učinke. Ispitivanje toksičnosti niza neionskih površinski aktivnih tvari iz skupine MyrjTM i BrijTM na Caco-2 staničnom modelu crijevnog epitela i na *ex vivo* modelu sluznice nosa svinje pokazalo je da nakon izlaganja modela određenoj koncentraciji površinski aktivnih tvari dolazi do ireverzibilnih oštećenja epitela (164). Na Caco-2 modelu većina je ispitanih površinski aktivnih tvari pri koncentraciji 0,1 mM uzrokovala ireverzibilni pad TEER-a na vrijednosti blizu 0, što je bilo popraćeno povećanom permeabilnošću manitola kroz monosloj stanica i povećanim nakupljanjem tripanskog modrila u oštećenim, mrtvim stanicama. Iako se *ex vivo model* sluznice nosa svinje pokazao otpornijim, pri određenim koncentracijama površinski aktivnih tvari (0,09-0,2 mM) također je nastupilo

smanjenje TEER-a, dok je daljnje povećanje koncentracije (0,4-0,6 mM) uzrokovalo ljuštenje epitela, što je potvrđeno histološkom analizom. Smatra se da su navedeni toksični učinci posljedica solubilizacije fosfolipida i drugih sastavnica stanične membrane epitelnih stanica uklapanjem u micelle površinski aktivnih tvari. Biokompatibilnost sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom pripremljenih u sklopu ovog doktorskog rada ispitana je na 2 različita modela.

4.2.11.1. Ispitivanje biokompatibilnosti *in vitro*

S obzirom na prethodne rezultate biokompatibilnosti primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom (odjeljak 4.1.5.), 3D HCE-T model izabran je za ispitivanje biokompatibilnosti sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozanom. Sukladno prethodnom istraživanju u kojem je ispitana biokompatibilnost komercijalno dostupne kationske nanoemulzije Cationorm® (Santen) na HCE-2 staničnoj liniji humanog epitela rožnice (115), sekundarne kationske nanoemulzije pripravljene u sklopu ovog doktorskog rada razrijeđene su 10 puta u HBSS puferu prije ispitivanja vijabilnosti. pH vrijednost HBSS pufera, koji je osim za razrjeđivanje formulacija korišten i kao negativna kontrola, iznosila je 6,0 kako bi se zadržao protonirani oblik kitozana. Vijabilnost modela nakon 30 minuta izlaganja pripremljenim nanoemulzijama određena je pomoću kolorimetrijskog MTT testa, a rezultati su prikazani slikom 23. Suspenzija ibuprofena u HBSS puferu je statistički značajno smanjila vijabilnost stanica na oko 85 % ($P = 0,0004$). Formulacije IN i INC1 s uklopljenim ibuprofenom te formulacije N i NC1 bez uklopljene djelatne tvari nisu narušile vijabilnost modela. Uklapanje ibuprofena unutar uljnih kapljica nanoemulzija vjerojatno smanjuje njegov izravni toksični učinak na stanice. Sličan učinak na vijabilnost MDCK-C7 epitelnih stanica psećeg bubrega primijećen je i nakon uklapanja kapsaicina u nanoemulzije i nanokapsule (sekundarne kationske nanoemulzije) s kitozanom (161). Dok je nakon trosatnog izlaganja slobodnom kapsaicinu (500 μ M) vijabilnost stanica pala na svega 10 %, izlaganje stanica nanoemulzijama ili nanokapsulama s jednakom koncentracijom uklopljenog kapsaicina nije uzrokovalo statistički značajno smanjenje vijabilnosti. Vijabilnost modela nakon izlaganja formulacijama s većim udjelom kitozana (INC2 i NC2) pripremljenim u sklopu ovog doktorskog rada iznosila je 93 i 88 %, što potvrđuje njihovu biokompatibilnost. Ipak, smanjenje vijabilnosti modela pokazalo se statistički značajnim u odnosu na negativnu kontrolu (INC2: $P = 0,0365$; NC2: $P = 0,0004$). Dobivene rezultate moguće je pripisati većem udjelu kitozana u formulacijama, što je u skladu s toksičnim učinkom kitozana ovisnim o koncentraciji (163).

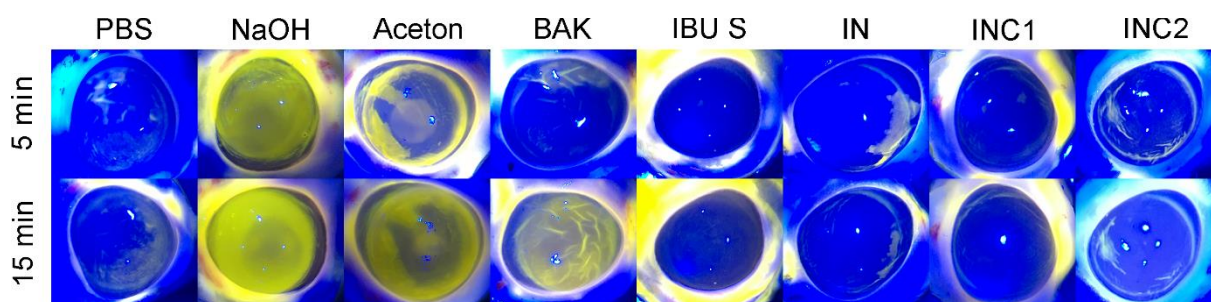


Slika 23. Vijabilnost 3D HCE-T modela nakon 30 minuta inkubacije s nanoemulzijama bez kitozana s uklopljenim ibuprofenom (IN) i bez ibuprofena (N), s nanoemulzijama s 0,05 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC1) i bez ibuprofena (NC1), s nanoemulzijama s 0,3 % (*m/m*) kitozana s uklopljenim ibuprofenom (INC2) i bez ibuprofena (NC2) te sa suspenzijom ibuprofena u HBSS puferu pH 6,0 (IBU S). Stanice inkubirane s čistim HBSS puferom pH 6,0 služile su kao negativna kontrola (vijabilnost = 100 %). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ($n = 6$). *Razlikuje se od negativne kontrole ($P < 0,05$).

4.2.11.2. Ispitivanje biokompatibilnosti *ex vivo*

Poznato je da *ex vivo* modeli omogućuju bolje predviđanje učinaka *in vivo* u odnosu na *in vitro* modele (98). Kako bi se biokompatibilnost pripremljenih nanoemulzija dodatno ispitala te kako bi se eventualno potvrdili rezultati dobiveni ispitivanjem na 3D *in vitro* modelu, u sklopu ovog doktorskog rada razvijen je *ex vivo* model rožnice svinje. Ispitivane nanoemulzije i kontrolne formulacije nanijete su na površinu rožnica te su rožnice inkubirane tijekom 5 i 15 minuta. Nakon uklanjanja formulacija i ispiranja rožnica puferom slijedila je vizualizacija nastalih oštećenja dodatkom otopine fluoresceina. Fluorescein se odavno rutinski koristi u kliničkoj praksi za bojenje oštećenja na rožnici i spojnici oka, a pretpostavljeni mehanizam bojenja je ulazak fluoresceina u stanice s narušenom barijernom funkcijom glikokaliksa te ulazak u međustanične prostore putem oštećenih čvrstih međustaničnih spojeva (165). Kobaltno plava lampa korištena je kako bi pojačala intenzitet fluorescencije i omogućila bolju vizualizaciju oštećenja. Nakon svakog vremena inkubacije snimljene su fotografije rožnica te su prikazane slikom 24. Dok PBS, korišten kao negativna kontrola, i suspenzija ibuprofena u PBS-u (2 mg mL^{-1}) nisu uzrokovali oštećenje rožnica, pozitivne kontrole (0,1 M NaOH i aceton) vidno su oštetile rožnice. BAK je primijenjen kao otopina u PBS-u u udjelu 0,025 % (*m/V*), što je

najveći udio odobren u kapima za oko (166). Oštećenje rožnica primjećuje se nakon 15-minutne inkubacije s otopinom BAK-a. Rezultati dobiveni nakon inkubacije rožnica s formulacijama IN, INC1 i INC2 u skladu su s rezultatima dobivenim na 3D *in vitro* modelu. Dok formulacije IN i INC1 nisu uzrokovale oštećenje rožnica tijekom cijelog perioda inkubacije, formulacija INC2 uzrokovala je blago oštećenje rožnica tek nakon 15 minuta inkubacije. U usporedbi s otopinom BAK-a, oštećenje uzrokovano INC2 formulacijom znatno je blaže.



Slika 24. Reprezentativne fotografije *ex vivo* modela rožnice svinje snimljene nakon 5 i 15 minuta inkubacije s nanoemulzijama s uklopljenim ibuprofenom bez kitozana (IN), s 0,05 % (*m/m*) kitozana (INC1) i s 0,3 % (*m/m*) kitozana (INC2) te s kontrolnim formulacijama (PBS pH 7,4, 0,1 M NaOH, aceton, otopina benzalkonijevog klorida (0,025 %, *m/V*) u PBS-u (BAK) i suspenzija ibuprofena (2 mg mL⁻¹) u PBS-u (IBU S)). Oštećenja nastala na rožnicama obojena su otopinom fluoresceina, a intenzitet fluorescencije povećan je korištenjem kobaltne plave lampe ($n \geq 4$).

Detaljna fizičko-kemijska i biofarmaceutska karakterizacija sekundarnih kationskih nanoemulzija s kitozansom s uklopljenim NSAR ukazuje na njihov potencijal u liječenju bolesti suhog oka. Prije daljnjih *in vivo* ispitivanja korisno bi bilo ispitati protuupalni učinak razvijenih formulacija na *in vitro* modelima bolesti suhog oka kako bi se ispitaio učinak i potencijalni doprinos same formulacije. Trenutno se većina modela bolesti suhog oka, odnosno modela upale temelji na monoslojevima primarnih stanica ili staničnih linija epitela rožnice ili spojnice koji se izlažu hiperosmolarnom mediju (400-550 mOsM) (167–170), smanjenoj relativnoj vlažnosti zraka (45 % pri 37 °C) (171) ili proupalnim citokinima (TNF- α , interferonu γ (IFN- γ), transformirajućem faktoru rasta β (TGF- β) te interleukinima (IL) 4, 6, 10, 13 i 17) (172–174) kako bi se potaknuo nastanak upale. U nekim se radovima spominje korištenje komercijalno dostupnog 3D HCE modela humanog epitela rožnice, kod kojeg se upala potiče izlaganjem uvjetima smanjene relativne vlažnosti zraka (< 40 %) i povišene temperature (40 °C), uz ili bez dodatka sorbitola (0,6 M) u medij za uzgoj modela (175, 176), dok je razvoj složenijih 3D modela bolesti suhog oka s kokulturama stanica tek u začetku (177). *In vitro*

model monosloja HCE-T stanica (2D model) u ovom se doktorskom radu pokazao kao pretjerano osjetljiv i time manje prikladan za ispitivanje biokompatibilnosti kationskih nanoemulzija, stoga je za ispitivanje protuupalnog učinka sekundarnih kationskih nanoemulzija s uklopljenim ibuprofenom nužan razvoj i detaljna karakterizacija prikladnog 3D *in vitro* modela bolesti suhog oka.

5. ZAKLJUČCI

5.1. PRIMARNE KATIONSKE NANOEMULZIJE SA STEARILAMINOM

Primarne kationske nanoemulzije sa stearylaminom uspješno su pripravljene visokoenergetskom metodom na mikrofluidizatoru.

Fizičko-kemijska karakterizacija pripremljenih nanoemulzija pokazala je malu veličinu kapljica (< 100 nm), mali PDI ($\leq 0,25$), pozitivan zeta-potencijal (3,1-25,5 mV) i pH unutar područja prihvatljivog za oftalmičku primjenu (6,82-8,69). Izmjerene se vrijednosti nisu bitno promijenile čak ni nakon 5 mjeseci pohrane pri 4 °C, što ukazuje na dobru stabilnost pripremljenih formulacija. Reološka karakterizacija pokazala je da su pripravljene nanoemulzije Newtonovi sustavi male viskoznosti (1,4-3,31 mPas), jednostavni za primjenu u obliku kapi za oko. Površinska napetost nanoemulzija s više od 0,05 % (*m/m*) stearylamina manja je od 35 mN m⁻¹, što bi moglo smanjiti ugodnost primjene takvih formulacija.

Ispitivanje na 3D staničnom modelu humanog epitela rožnice ukazuje na biokompatibilnost svih pripremljenih formulacija.

Mjerenjem veličine kapljica i zeta-potencijala nakon miješanja s disperzijom mucina utvrđene su interakcije primarnih kationskih nanoemulzija sa stearylaminom i mucina, no nije primijećeno da su interakcije izraženije s porastom udjela stearylamina u formulaciji na više od 0,05 % (*m/m*).

Na temelju provedenih ispitivanja, primarna kationska nanoemulzija s 0,05 % (*m/m*) stearylamina, 5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, 2,5 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL, 2,5 % (*m/m*) glicerola i pročišćenom vodom do 100 % (*m/m*) ističe se kao vodeća formulacija s najvećim potencijalom za primjenu kod bolesti suhog oka. Osim za ublažavanje simptoma bolesti, ova bi funkcionalna nanoemulzija mogla služiti i kao tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari namijenjenih za liječenje bolesti suhog oka. Zadržavanje mukoadhezivnih svojstava, uz najmanji mogući udio stearylamina ključno je za učinkovitost i sigurnost primjene razvijene formulacije.

5.2. SEKUNDARNE KATIONSKE NANOEMULZIJE S KITOZANOM

Sekundarne kationske nanoemulzije s kitozanom uspješno su pripravljene visokoenergetskom metodom na mikrofluidizatoru.

Metoda pripreme kod koje se otopina kitozana dodaje u vodenu fazu prije obrade formulacije na mikrofluidizatoru pokazala se prikladnijom i jednostavnijom od najčešće korištene metode kod koje se otopina kitozana dodaje u prethodno pripravljenu primarnu anionsku nanoemulziju.

Navedenom metodom pripravljene su formulacije s manjim (NC1: 0,05 %, *m/m*) i većim (NC2: 0,3 %, *m/m*) udjelom kitozana koje su okarakterizirane malom veličinom kapljica (< 200 nm), malim PDI (< 0,2) i pozitivnim zeta-potencijalom (18,7-30,0 mV). Iako je formulacija NC1 pokazala bolju stabilnost u odnosu na formulaciju NC2, ibuprofen je uspješno uklopljen u obje formulacije.

Uklapanjem ibuprofena došlo je do porasta zeta-potencijala formulacija (24,6-38,6 mV), a primijećen je i porast PDI kod formulacije INC2. Kod obje formulacije pH iznosi oko 4,4, što je još uvijek prihvatljivo za oftalmičku primjenu. Izmjerena osmolarnost formulacija je unutar fizioloških vrijednosti suznog filma, a njihova površinska napetost iznosi oko 35 mN m⁻¹. Reološka karakterizacija pokazala je da su pripravljene formulacije Newtonovi sustavi male viskoznosti (1,9-4,1 mPas), što omogućuje ugodnost i jednostavnost primjene te ujednačenost doziranja. Nakon mjesec dana pohrane pri 4 °C formulacija INC1 s manjim udjelom kitozana ponovno je pokazala bolju stabilnost od formulacije INC2, iako kod niti jedne formulacije nije primijećeno vrhnjenje, kao ni razdvajanje faza.

Bakteriološka filtracija je metoda izbora za sterilizaciju pripremljenih nanoemulzija, dok autoklaviranje narušava njihovu stabilnost.

Ispitivanje *in vitro* oslobađanja pokazalo je značajno brže oslobađanje ibuprofena iz nanoemulzija u usporedbi s uljnom otopinom i suspenzijom ibuprofena, što je poželjno kod vremenski ograničenog kontakta formulacije i površine oka. Dodatak kitozana u formulaciju blago usporava oslobađanje uklopljene djelatne tvari.

Ispitivanje mukoadhezivnih svojstava nanoemulzija reološkom metodom nakon miješanja s disperzijom mucina pokazalo je značajno veću mukoadhezivnost formulacija s kitozanom u odnosu na kontrolnu formulaciju bez kitozana (IN), što ukazuje na mogućnost njihovog produljenog zadržavanja na površini oka. Ipak, nije utvrđena statistički značajna razlika u

mukoadhezivnosti između formulacija INC1 i INC2, što ukazuje na to da formulacija sa 6 × većim udjelom kitozana nije nužno i mukoadhezivnija.

Ispitivanje biokompatibilnosti na 3D *in vitro* modelu humanog epitela rožnice i na *ex vivo* modelu rožnice svinje pokazalo je izuzetnu biokompatibilnost INC1 formulacije, dok je INC2 formulacija malo, ali statistički značajno smanjila vijabilnost *in vitro* modela te uzrokovala blago oštećenje rožnice *ex vivo* modela.

S obzirom na provedena ispitivanja, kao formulacija s najvećim potencijalom za liječenje bolesti suhog oka ističe se INC1 formulacija sastavljena od 0,2 % (*m/m*) ibuprofena, 0,05 % (*m/m*) kitozana, 2,5 % (*m/m*) Miglyol[®]-a 812, 0,05 % (*m/m*) lecitina, 0,25 % (*m/m*) Kolliphor[®]-a EL, 2,5 % (*m/m*) glicerola i pročišćene vode do 100 % (*m/m*), kod koje dodatak kitozana u vrlo malom udjelu omogućuje mukoadhezivnost, uz istovremeno zadržavanje stabilnosti i netoksičnosti. Fizičko-kemijska karakterizacija ukazuje na sličnost INC1 formulacije s komercijalno dostupnim nanoemulzijama pripremljenim Novasorb[®] tehnologijom. Osim za početnu kratkotrajnu primjenu uz kapi za oko s ciklosporinom A kod težih slučajeva bolesti suhog oka, INC1 formulacija mogla bi biti prikladna i za liječenje blažih do umjerenih oblika bolesti, dok bi bez uklopljene djelatne tvari ova funkcionalna formulacija mogla služiti za učinkovito ublažavanje simptoma bolesti suhog oka.

6. LITERATURA

1. Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):438–510.
2. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:7–23.
3. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. *Organa sensum, osjetni organi.* U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A, ur. *Anatomija čovjeka. 2., korigirano izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2007. 533–8.
4. Harvey TM, Fernandez AGA, Patel R, Goldman D, Ciralsky J. *Conjunctival Anatomy and Physiology.* U: Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB, ur. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film.* 1st ed. London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Saunders; 2013. 23–7.
5. Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, Holopainen JM, Laurie GW, Millar TJ, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3): 366–403.
6. Craig J. Structure and function of the preocular tear film. U: Korb DR, ur. *The tear film: Structure, function, and clinical examination.* Oxford, Boston: Butterworth-Heinemann; 2002. 18–50.
7. Cwiklik L. Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858(10):2421–30.
8. Lemp MA. Advances in Understanding and Managing Dry Eye Disease. *Am J Ophthalmol.* 2008;146(3):350-356.e1.
9. Hydrelo™ Allergy Lubricant Eye Drops infused by natural Ectoin® 2%. Dostupno na: <https://www.hydrelo.com/hydrelo-allergy>. [pristupljeno: 27. travnja 2020.].
10. Craig JP, Daniel Nelson J, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf.* 2017;15(4):802–12.
11. Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo C-K, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):276–83.
12. Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2015;112(5):71–82.

13. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334–65.
14. The Epidemiology of Dry Eye Disease: Report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):93–107.
15. Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):575–628.
16. Pucker AD, Ng SM, Nichols JJ. Over the counter (OTC) artificial tear drops for dry eye syndrome. *Cochrane database Syst Rev.* 2016;2:CD009729–CD009729.
17. Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue J-S. Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv.* 2012;2012:604204.
18. Garrigue J-S, Amrane M, Faure M-O, Holopainen JM, Tong L. Relevance of Lipid-Based Products in the Management of Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017;33(9):647–61.
19. Craig JP, Purslow C, Murphy PJ, Wolffsohn JSW. Effect of a liposomal spray on the pre-ocular tear film. *Contact Lens Anterior Eye.* 2010;33(2):83–7.
20. Colligris B, Crooke A, Huete-Toral F, Pintor J. An update on dry eye disease molecular treatment: advances in drug pipelines. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(10):1371–90.
21. Agarwal P, Rupenthal ID. Modern approaches to the ocular delivery of cyclosporine A. *Drug Discov Today.* 2016;21(6):977–88.
22. Byun YJ, Kim TI, Kwon SM, Seo KY, Kim SW, Kim EK, et al. Efficacy of combined 0.05% cyclosporine and 1% methylprednisolone treatment for chronic dry eye. *Cornea.* 2012;31(5):509–13.
23. Takeuchi H, Okuyama K, Konno O, Jojima Y, Akashi I, Nakamura Y, et al. Optimal Dose and Target Trough Level in Cyclosporine and Tacrolimus Conversion in Renal Transplantation as Evaluated by Lymphocyte Drug Sensitivity and Pharmacokinetic Parameters. *Transplant Proc.* 2005;37(4):1745–7.

24. Sun Y, Zhang R, Gadek TR, O'Neill CA, Pearlman E. Corneal inflammation is inhibited by the LFA-1 antagonist, lifitegrast (SAR 1118). *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;29(4):395–402.
25. Abidi A, Shukla P, Ahmad A. Lifitegrast: A novel drug for treatment of dry eye disease. *J Pharmacol Pharmacother.* 2016;7(4):194.
26. Sheppard JD, Comstock TL, Cavet ME. Impact of the Topical Ophthalmic Corticosteroid Loteprednol Etabonate on Intraocular Pressure. *Adv Ther.* 2016;33(4):532–52.
27. Cutolo CA, Barabino S, Bonzano C, Traverso CE. The Use of Topical Corticosteroids for Treatment of Dry Eye Syndrome. *Ocul Immunol Inflamm.* 2019;27(2):266–75.
28. Sawazaki R, Ishihara T, Usui S, Hayashi E, Tahara K, Hoshino T, et al. Diclofenac Protects Cultured Human Corneal Epithelial Cells Against Hyperosmolarity and Ameliorates Corneal Surface Damage in a Rat Model of Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(4):2547–56.
29. Isawi H, Dhaliwal DK. Corneal melting and perforation in Stevens Johnson syndrome following topical bromfenac use. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33(9):1644–6.
30. Kuklinski E, Asbell PA. Sjogren's syndrome from the perspective of ophthalmology. *Clin Immunol.* 2017;182:55–61.
31. Benitez-Del-Castillo JM, Moreno-Montañés J, Jiménez-Alfaro I, Muñoz-Negrete FJ, Turman K, Palumaa K, et al. Safety and Efficacy Clinical Trials for SYL1001, a Novel Short Interfering RNA for the Treatment of Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(14):6447–54.
32. Subrizi A, del Amo EM, Korzhikov-Vlakh V, Tennikova T, Ruponen M, Urtti A. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties. *Drug Discov Today.* 2019;24(8):1446–57.
33. Davies NM. Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(7):558–62.
34. Karki R, Meena M, Prakash T, Rajeswari T, Goli D, Kumar S. Reduction in drop size of ophthalmic topical drop preparations and the impact of treatment. *J Adv Pharm*

- Technol Res. 2011;2(3):192.
35. Shell JW. Ophthalmic drug delivery systems. *Surv Ophthalmol*. 1984;29(2):117–28.
 36. Senjković R. Osnove oblikovanja lijekova. 2. izdanje. Krznarić Vohalski G, ur. Zagreb: Školska knjiga; 2003. 119–120.
 37. Reimondez-Troitiño S, Csaba N, Alonso MJ, de la Fuente M. Nanotherapies for the treatment of ocular diseases. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95:279–93.
 38. Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):357–68.
 39. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. *Pharm Res*. 2011;28(5):978–85.
 40. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28–49.
 41. Lallemand F, Schmitt M, Bourges J-L, Gurny R, Benita S, Garrigue J-S. Cyclosporine A delivery to the eye: A comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;117:14–28.
 42. Ismailos G, Reppas C, Dressman JB, Macheras P. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(4):287–9.
 43. Gore A, Pujara C, Attar M, Neervannan S. Ocular emulsions and dry eye: a case study of a non-biological complex drug product delivered to a complex organ to treat a complex disease. *GaBI Journal*. 2017;6(1):13–23.
 44. Gan L, Wang J, Jiang M, Bartlett H, Ouyang D, Eperjesi F, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*. 2013;18(5–6):290–7.
 45. Maïssa C, Guillon M, Simmons P, Vehige J. Effect of castor oil emulsion eyedrops on tear film composition and stability. *Contact Lens Anterior Eye*. 2010;33(2):76–82.
 46. Hsu J-P, Nacu A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *J Colloid Interface Sci*. 2003;259(2):374–81.

47. Jumaa M, Müller BW. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *Int J Pharm.* 1999;183(2):175–84.
48. Ruponen M, Urtti A. Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:442–6.
49. Sznitowska M, Janicki S, Dabrowska EA, Gajewska M. Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15(5):489–95.
50. Simmons PA, Carlisle-Wilcox C, Chen R, Liu H, Vehige JG. Efficacy, Safety, and Acceptability of a Lipid-Based Artificial Tear Formulation: A Randomized, Controlled, Multicenter Clinical Trial. *Clin Ther.* 2015;37(4):858–68.
51. Klang V, Valenta C. Lecithin-based nanoemulsions. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2011;21(1):55–76.
52. Martini É, Fattal E, de Oliveira MC, Teixeira H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. *Int J Pharm.* 2008;352(1–2):280–6.
53. Fraga M, Bruxel F, Lagranha VL, Teixeira HF, Matte U. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2213–20.
54. Fraga M, Laux M, Zandoná B, Santos GR, dos Santos Giuberti C, de Oliveira MC, et al. Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2008;18(6):398–403.
55. Klang SH, Frucht-Pery J, Hoffman A, Benita S. Physicochemical Characterization and Acute Toxicity Evaluation of a Positively-charged Submicron Emulsion Vehicle. *J Pharm Pharmacol.* 1994;46(12):986–93.
56. de Araújo SC, de Mattos ACA, Teixeira HF, Coelho PMZ, Nelson DL, de Oliveira MC. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. *Int J Pharm.* 2007;337(1–2):307–15.
57. Jeong M-W, Oh S-G, Kim YC. Effects of amine and amine oxide compounds on the

- zeta-potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2001;181(1–3):247–53.
58. de la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo B, Alonso MJ. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):100–17.
 59. Bouyer E, Mekhloufi G, Rosilio V, Grossiord J-LL, Agnely F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int J Pharm.* 2012;436(1–2):359–78.
 60. Chiappisi L, Gradzielski M. Co-assembly in chitosan-surfactant mixtures: Thermodynamics, structures, interfacial properties and applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015;220:92–107.
 61. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J Control Release.* 2018;270:203–25.
 62. Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):312–34.
 63. Walsh K, Jones L. The use of preservatives in dry eye drops. *Clin Ophthalmol.* 2019;13:1409–25.
 64. Yu F, Liu X, Zhong Y, Guo X, Li M, Mao Z, et al. Sodium Hyaluronate Decreases Ocular Surface Toxicity Induced by Benzalkonium Chloride–Preserved Latanoprost: An In Vivo Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(5):3385–93.
 65. She Y, Li J, Xiao B, Lu H, Liu H, Simmons PA, et al. Evaluation of a Novel Artificial Tear in the Prevention and Treatment of Dry Eye in an Animal Model. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2015;31(9):525–30.
 66. Physical Tests and Determinations <771> Ophthalmic products - Quality tests. U: United States Pharmacopeia 40. Second Sup. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2017. 8589–8595.
 67. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter.* 2006;18(41):

R635–R666.

68. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*. 2016;12(11):2826–41.
69. Qadir A, Faiyazuddin MD, Talib Hussain MD, Alshammari TM, Shakeel F. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. *J Mol Liq*. 2016;214:7–18.
70. García-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. *Nanocolloids A Meet Point Sci Technol*. 2016;2:365–88.
71. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2012;17(5):246–54.
72. Anton N, Vandamme TF. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm*. 2009;377(1–2):142–7.
73. Anton N, Gayet P, Benoit J-P, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *Int J Pharm*. 2007;344(1–2):44–52.
74. Liu W, Sun D, Li C, Liu Q, Xu J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J Colloid Interface Sci*. 2006;303(2):557–63.
75. Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen C, Garcia MJ, Azemar N, et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir*. 2002;18(1):26–30.
76. Dario MF, Santos MSCS, Viana AS, Arêas EPG, Bou-Chacra NA, Oliveira MC, et al. A high loaded cationic nanoemulsion for quercetin delivery obtained by sub-PIT method. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2016;489:256–64.
77. Eye preparations. U: European Pharmacopoeia 10.0. Strassbourg: Council of Europe. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2020. 909–11.
78. Chowhan M, Lang JC, Missel P. Ophthalmic preparations. U: Felton L, ur. Remington: Essentials of Pharmaceutics. 1st ed. London, UK: Pharmaceutical Press; 2013. 552–3.

79. Methods of preparation of sterile products. U: European Pharmacopoeia 8.0. Strassbourg: Council of Europe. Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2013. 555–6.
80. Gué E, Since M, Ropars S, Herbinet R, Le Pluart L, Malzert-Fréon A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int J Pharm.* 2016;498(1–2):49–65.
81. Rahn-Chique K, Puertas AM, Romero-Cano MS, Rojas C, Urbina-Villalba G. Nanoemulsion stability: Experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. *Adv Colloid Interface Sci.* 2012;178:1–20.
82. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;108–109:303–18.
83. Helgeson ME. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2016;25:39–50.
84. Choi SH, Lionberger RA. Clinical, Pharmacokinetic, and In Vitro Studies to Support Bioequivalence of Ophthalmic Drug Products. *AAPS J.* 2016;18(4):1032–8.
85. Walenga RL, Babiskin AH, Zhang X, Absar M, Zhao L, Lionberger RA. Impact of Vehicle Physicochemical Properties on Modeling-Based Predictions of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion Bioavailability and Tear Film Breakup Time. *J Pharm Sci.* 2019;108(1):620–9.
86. Gutiérrez JM, González C, Maestro A, Solè I, Pey CM, Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2008;13(4):245–51.
87. Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron.* 2012;43(2–3):85–103.
88. Preetz C, Hauser A, Hause G, Kramer A, Mäder K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *Eur J Pharm Sci.* 2010;39(1–3):141–51.
89. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337–51.

90. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A Link between Tear Instability and Hyperosmolarity in Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3671–9.
91. Hotujac Grgurević M, Juretić M, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(2):275–82.
92. Ludwig A, Reimann H. Eye. U: Bouwman-Boer Y, Fenton-May V, Le Brun P, ur. *Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products.* Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer International Publishing; 2015. 163–88.
93. Khatri P, Shao J. Separation of external aqueous phase from o/w nanoemulsions. *Eur J Pharm Sci.* 2017;96:171–5.
94. Adi AC, Christanto C, Rachmawati H, Adlia A. Vitamin E-based Folic Acid Nanoemulsion: Formulation and Physical Evaluation for Oral Administration. *Pharm Nanotechnol.* 2019;7(4):304–13.
95. Brayden DJ, Gleeson J, Walsh EG. A head-to-head multi-parametric high content analysis of a series of medium chain fatty acid intestinal permeation enhancers in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(3):830–9.
96. Wilson SL, Ahearne M, Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology.* 2015;327:32–46.
97. Dholakiya SL, Barile FA. Alternative methods for ocular toxicology testing: validation, applications and troubleshooting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(6):699–712.
98. Pepić I, Lovrić J, Cetina-Čižmek B, Reichl S, Filipović-Grčić J. Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models. *Drug Discov Today.* 2014;19(1):31–44.
99. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60(2):207–25.
100. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al. An

- SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(3):614–21.
101. Juretić M, Jurišić Dukovski B, Krtalić I, Reichl S, Cetina-Čižmek B, Filipović-Grčić J, et al. HCE-T cell-based permeability model: A well-maintained or a highly variable barrier phenotype? *Eur J Pharm Sci.* 2017;104:23–30.
 102. Aslantürk Ö. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. U: Larramendy ML, Soloneski S, ur. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World.* London: IntechOpen; 2018. 1–17.
 103. Morais JM, Burgess DJ. In vitro release testing methods for vitamin E nanoemulsions. *Int J Pharm.* 2014;475(1–2):393–400.
 104. Jug M, Hafner A, Lovrić J, Kregar ML, Pepić I, Vanić Ž, et al. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:350–66.
 105. Singh I, Rana V. Techniques for the Assessment of Mucoadhesion in Drug Delivery Systems: An Overview. *J Adhes Sci Technol.* 2012;26(18–19):2251–67.
 106. Rossi S, Vigani B, Bonferoni MC, Sandri G, Caramella C, Ferrari F. Rheological analysis and mucoadhesion: A 30 year-old and still active combination. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;156:232–8.
 107. Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(2):259–71.
 108. Bassi da Silva J, Ferreira SB de S, de Freitas O, Bruschi ML. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(7):1053–70.
 109. Hassan EE, Gallo JM. A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength. *Pharm Res.* 1990;7(5):491–495.
 110. Kesavan K, Kant S, Singh PN, Pandit JK. Mucoadhesive Chitosan-Coated Cationic Microemulsion of Dexamethasone for Ocular Delivery: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Curr Eye Res.* 2013;38(3):342–52.

111. Griebinger J, Dünnhaupt S, Cattoz B, Griffiths P, Oh S, Gómez SB i, et al. Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:464–76.
112. Hafner A, Lovrić J, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Cetina-Čizmek B, et al. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci.* 2015;75:142–50.
113. Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66(2):227–43.
114. Pereira de Sousa I, Steiner C, Schmutzler M, Wilcox MD, Veldhuis GJ, Pearson JP, et al. Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97:273–9.
115. Kinnunen K, Kauppinen A, Piippo N, Koistinen A, Toropainen E, Kaarniranta K. Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures. *Exp Eye Res.* 2014;120:82–9.
116. Pauly A, Meloni M, Brignole-Baudouin F, Warnet J-M, Baudouin C. Multiple Endpoint Analysis of the 3D-Reconstituted Corneal Epithelium after Treatment with Benzalkonium Chloride: Early Detection of Toxic Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(4):1644–52.
117. Diaz DA, Colgan ST, Langer CS, Bandi NT, Likar MD, Van Alstine L. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *AAPS J.* 2016;18(1):15–22.
118. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(15):1663–73.
119. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 5th ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2006. 535.
120. Wan LSC, Lee PFS. CMC of Polysorbates. *J Pharm Sci.* 1974;63(1):136–7.
121. Hagigit T, Abdulrazik M, Orucov F, Valamanesh F, Lambert M, Lambert G, et al.

- Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye. *J Control Release*. 2010;145(3):297–305.
122. Hagigit T, Abdulrazik M, Valamanesh F, Behar-Cohen F, Benita S. Ocular antisense oligonucleotide delivery by cationic nanoemulsion for improved treatment of ocular neovascularization: An in-vivo study in rats and mice. *J Control Release*. 2012;160(2):225–31.
 123. Uluata S, Decker EA, McClements DJ. Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability. *Food Biophys*. 2016;11(1):52–9.
 124. Silva HD, Cerqueira MA, Vicente AA. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *J Food Eng*. 2015;167:89–98.
 125. Brösel S, Schubert H. Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve. *Chem Eng Process Process Intensif*. 1999;38(4–6):533–40.
 126. Teixeira HF, Bruxel F, Fraga M, Schuh RS, Zorzi GK, Matte U, et al. Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. *Int J Pharm*. 2017;534(1–2):356–67.
 127. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, Tomlinson A, Calonge M, Boboridis KG, et al. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *Ocul Surf*. 2013;11(4):246–58.
 128. Wang J-J, Sung KC, Hu OY-P, Yeh C-H, Fang J-Y. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. *J Control Release*. 2006;115(2):140–9.
 129. Washington C, Davis SS. Ageing effects in parenteral fat emulsions: the role of fatty acids. *Int J Pharm*. 1987;39(1–2):33–7.
 130. Pai R V., Monpara JD, Vavia PR. Exploring molecular dynamics simulation to predict binding with ocular mucin: An in silico approach for screening mucoadhesive materials for ocular retentive delivery systems. *J Control Release*. 2019;309:190–202.
 131. Krtalić I, Radošević S, Hafner A, Grassi M, Nenadić M, Cetina-Čižmek B, et al. D-

- Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1562–71.
132. Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O' Brien FJ, O' Driscoll CM. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release.* 2015;215:39–54.
 133. Weyenberg W, Filev P, Van den Plas D, Vandervoort J, De Smet K, Sollie P, et al. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *Int J Pharm.* 2007;337(1–2):291–8.
 134. Wilson SE, Perry HD. Long-term Resolution of Chronic Dry Eye Symptoms and Signs after Topical Cyclosporine Treatment. *Ophthalmology.* 2007;114(1):76–9.
 135. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. *Ophthalmology.* 1999;106(4):811–6.
 136. Schechter BA. Ketorolac During the Induction Phase of Cyclosporin-A Therapy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2006;22(2):150–4.
 137. Shine WE, McCulley JP. Keratoconjunctivitis Sicca Associated With Meibomian Secretion Polar Lipid Abnormality. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(7):849–52.
 138. Trotta M, Pattarino F, Ignoni T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002;53(2):203–8.
 139. Tsume Y, Langguth P, Garcia-Arieta A, Amidon GL. In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen. *Biopharm Drug Dispos.* 2012;33(7):366–77.
 140. Shi Y, Zou M, An Y, Ji Z, Gao P, Cheng G. A potent preparation method combining neutralization with microfluidization for rebamipide nanosuspensions and its in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39(7):996–1004.
 141. Jumaa M, Müller BW. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *Int J Pharm.* 1998;163(1–2):81–9.
 142. Yamaguchi M, Ueda K, Isowaki A, Ohtori A, Takeuchi H, Ohguro N, et al. Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Ophthalmic Lipid Emulsion Containing

- Indomethacin in Tear Fluid. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(7):1266–71.
143. Li J, Hwang I-CC, Chen X, Park HJ. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocoll.* 2016;60:138–47.
 144. Gallarate M, Chirio D, Bussano R, Peira E, Battaglia L, Baratta F, et al. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. *Int J Pharm.* 2013;440(2):126–34.
 145. Mun S, Decker EA, McClements DJ. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2006;296(2):581–90.
 146. Nguyen S, Hisiger S, Jolicoeur M, Winnik FM, Buschmann MD. Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and ¹H NMR after semi-preparative SEC. *Carbohydr Polym.* 2009;75(4):636–45.
 147. Isailović T, Dorđević S, Marković B, Randelović D, Cekić N, Lukić M, et al. Biocompatible Nanoemulsions for Improved Aceclofenac Skin Delivery: Formulation Approach Using Combined Mixture-Process Experimental Design. *J Pharm Sci.* 2016;105(1):308–23.
 148. Dorđević SM, Cekić ND, Savić MM, Isailović TM, Randelović D V., Marković BD, et al. Parenteral nanoemulsions as promising carriers for brain delivery of risperidone: Design, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm.* 2015;493(1–2):40–54.
 149. Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, Maltese A, Puleo A, Puglisi G. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *Eur J Pharm Sci.* 2002;16(1–2):53–61.
 150. Almeida H, Lobão P, Frigerio C, Fonseca J, Silva R, Quaresma P, et al. Development of mucoadhesive and thermosensitive eyedrops to improve the ophthalmic bioavailability of ibuprofen. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;35:69–80.
 151. Li X, Nie S, Kong J, Li N, Ju C, Pan W. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm.* 2008;363(1–2):177–82.

152. Fialho SL, Da Silva-Cunha A. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2004;32(6):626–32.
153. Yamada M, Kawai MM, Mochizuki H, Hata Y, Mashima Y. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Curr Eye Res.* 1998;17(10):1005–9.
154. Khurana AK, Chaudhary R, Ahluwalia BK, Gupta S. Tear film profile in dry eye. *Acta Ophthalmol.* 1991;69(1):79–86.
155. Norn MS. Tear fluid pH in normals, contact lens wearers, and pathological cases. *Acta Ophthalmol.* 1988;66(5):485–9.
156. Payet L, Terentjev EM. Emulsification and Stabilization Mechanisms of O/W Emulsions in the Presence of Chitosan. *Langmuir.* 2008;24(21):12247–52.
157. Rao CS, Schoenwald RD, Barfknecht CF, Laban SL. Biopharmaceutical evaluation of ibufenac, ibuprofen, and their hydroxyethoxy analogs in the rabbit eye. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1992;20(4):357–88.
158. Baydoun L, Düvel A, Daniels R, Drust A, Goldhagen T, Schwan I, et al. Comparison of different ibuprofen-amino acid compounds with respect to emulsifying and cytotoxic properties. *Int J Pharm.* 2004;274(1–2):157–65.
159. Lim L-Y, Khor E, Ling C-E. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(2):111–6.
160. Hussain A, Smith G, Khan KA, Bukhari NI, Pedge NI, Ermolina I. Solubility and dissolution rate enhancement of ibuprofen by co-milling with polymeric excipients. *Eur J Pharm Sci.* 2018;123:395–403.
161. Kaiser M, Pereira S, Pohl L, Ketelhut S, Kemper B, Gorzelanny C, et al. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Sci Rep.* 2015;5(1):10048.
162. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy V V. Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules.* 2008;9(7):1837–42.

163. Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, Carvalho ELS, Orea M, Calonge M, et al. Ocular drug delivery by liposome–chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials*. 2007;28(8):1553–64.
164. Ekelund K, Östh K, Pålhorstorp C, Björk E, Ulvenlund S, Johansson F. Correlation Between Epithelial Toxicity and Surfactant Structure as Derived From the Effects of Polyethyleneoxide Surfactants on Caco-2 Cell Monolayers and Pig Nasal Mucosa. *J Pharm Sci*. 2005;94(4):730–44.
165. Bron AJ, Argüeso P, Irkeç M, Bright FV. Clinical staining of the ocular surface: Mechanisms and interpretations. *Prog Retin Eye Res*. 2015;44:36–61.
166. FDA Drug Databases: Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. Dostupno na: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm?event=BasicSearch.page>. [pristupljeno: 10. srpnja 2019.].
167. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostène W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis*. 2012;18:851–63.
168. Corrales RM, Luo L, Chang EY, Pflugfelder SC. Effects of Osmoprotectants on Hyperosmolar Stress in Cultured Human Corneal Epithelial Cells. *Cornea*. 2008;27(5):574–9.
169. Luo L, Li D-Q, Pflugfelder SC. Hyperosmolarity-Induced Apoptosis in Human Corneal Epithelial Cells Is Mediated by Cytochrome c and MAPK Pathways. *Cornea*. 2007;26(4):452–60.
170. Li D-Q, Luo L, Chen Z, Kim H-S, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 β , TNF- α and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2006;82(4):588–96.
171. Rangarajan R, Kraybill B, Ogundele A, Ketelson HA. Effects of a Hyaluronic Acid/Hydroxypropyl Guar Artificial Tear Solution on Protection, Recovery, and Lubricity in Models of Corneal Epithelium. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015;31(8):491–7.
172. Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C,

- Fernández I, et al. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: An in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine*. 2008;44(1):160–7.
173. Contreras-Ruiz L, Schulze U, García-Posadas L, Arranz-Valseo I, López-García A, Paulsen F, et al. Structural and Functional Alteration of Corneal Epithelial Barrier Under Inflammatory Conditions. *Curr Eye Res*. 2012;37(11):971–81.
174. Soriano-Romaní L, Vicario-de-la-Torre M, Crespo-Moral M, López-García A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT, et al. Novel anti-inflammatory liposomal formulation for the pre-ocular tear film: In vitro and ex vivo functionality studies in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2017;154:79–87.
175. Meloni M, De Servi B, Marasco D, Del Prete S. Molecular mechanism of ocular surface damage: application to an in vitro dry eye model on human corneal epithelium. *Mol Vis*. 2011;17:113–26.
176. Barabino S, De Servi B, Aragona S, Manenti D, Meloni M. Efficacy of a New Ocular Surface Modulator in Restoring Epithelial Changes in an In Vitro Model of Dry Eye Syndrome. *Curr Eye Res*. 2017;42(3):358–63.
177. Lu Q, Yin H, Grant MP, Elisseff JH. An In Vitro Model for the Ocular Surface and Tear Film System. *Sci Rep*. 2017;7(1):6163.

ŽIVOTOPIS

Bisera Jurišić Dukovski (r. Jurišić) rođena je u Puli 3. studenog 1989. godine. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila je u Puli, a 2008. godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom „Ispitivanje transkornealne permeabilnosti fluorescentnih obilježivača“ izradila je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasmine Lovrić. Diplomirala je 2013. godine i stekla naslov magistre farmacije, nakon čega je odradila pripravnički staž u Istarskim ljekarnama u Puli. Stručni ispit magistara farmacije položila je 2015. godine i time dobila odobrenje za samostalan rad u ljekarničkoj djelatnosti. 2015. godine zaposlila se kao stručni suradnik (od 2017. kao asistent) na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“. Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti (grana Farmacija) na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2015. godine. Od 2018. godine zaposlena je kao asistent doktorand financiran iz državnog proračuna na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Biofarmacija s farmakokinetikom, Oblikovanje lijekova, Magistralna receptura i Kozmetologija. Do sada je u koautorstvu objavila deset znanstvenih radova zastupljenih u bazi *Web of Science Core Collection*. Aktivno je sudjelovala na stranim i domaćim znanstvenim skupovima s dva usmena i devet posterskih priopćenja. Održala je nekoliko radionica i prezentacija na Danima otvorenih vrata Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Festivalu znanosti. Od 2018. godine član je Hrvatske ljekarničke komore.

Popis radova:

Račić, A., Čalija, B., Milić, J., **Jurišić Dukovski, B.**, Lovrić, J., Dobričić, V., Micov, A., Vuković, M., Stepanović-Petrović, R., Krajišnik, D. Formulation of olopatadine hydrochloride viscous eye drops – physicochemical, biopharmaceutical and efficacy assessment using in vitro and in vivo approaches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021; 166: 105906.

Bíró, T., Bocsik, A., **Jurišić Dukovski, B.**, Gróf, I., Lovrić, J., Csóka, I., A Deli, M., Aigner, Z. New Approach in Ocular Drug Delivery: In vitro and ex vivo Investigation of Cyclodextrin-Containing, Mucoadhesive Eye Drop Formulations. *Drug Design, Development and Therapy*, 2021; 15: 351-360.

Gaggero, A., **Jurišić Dukovski, B.**, Radić, I., Šagud, I., Škorić, I., Cinčić, D., Jug, M. Co-grinding with surfactants as a new approach to enhance in vitro dissolution of praziquantel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020; 189: 113494.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020; 576: 118979.

Radić, K., **Jurišić Dukovski, B.**, Vitali Čepo, D. Influence of Pomace Matrix and Cyclodextrin Encapsulation on Olive Pomace Polyphenols' Bioaccessibility and Intestinal Permeability. *Nutrients*, 2020; 12: 669.

Antolić, K., Juretić, M., **Jurišić Dukovski, B.**, Hafner, A., Lovrić, J., Pepić, I. Cryocornea – toward enhancing the capacity and throughput of ex vivo corneal model. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2019; 45 (12): 1856-1861.

Jurišić Dukovski, B., Bračko, A., Šare, M., Pepić, I., Lovrić, J. In vitro evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery. *Acta Pharmaceutica*, 2019; 69 (4): 621-634.

Jurišić Dukovski, B., Mrak, L., Winnicka, K., Szekalska, M., Juretić, M., Filipović-Grčić, J., Pepić, I., Lovrić, J., Hafner, A. Spray-dried nanoparticle-loaded pectin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying Technology*, 2019; 37 (15): 1915-1925.

Jurišić Dukovski, B., Plantić, I., Čunčić, I., Krtalić, I., Juretić, M., Pepić, I., Lovrić, J., Hafner, A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017; 533 (2): 480-487.

Juretić, M., **Jurišić Dukovski, B.**, Krtalić, I., Reichl, S., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., Lovrić, J., Pepić, I. HCE-T cell-based permeability model: A well- maintained or a highly variable barrier phenotype? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017; 104: 23-30.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Doktorski rad

RAZVOJ FUNKCIONALNIH KATIONSKIH NANOEMULZIJA ZA LIJEČENJE BOLESTI SUHOG OKA

Bisera Jurišić Dukovski

SAŽETAK

Bolest suhog oka je multifaktorijalna bolest koju karakterizira nestabilnost i hiperosmolarnost suznog filma te upala površine oka. Kationske nanoemulzije tipa ulje u vodi (U/V) predstavljaju napredak u liječenju bolesti suhog oka služeći kao tehnološka platforma za uklapanje slabo topljivih djelatnih tvari, omogućujući pritom njihovo produljeno zadržavanje na površini oka te istodobnu nadoknadu i stabilizaciju narušenog suznog filma. Cilj ovog doktorskog rada je razvoj funkcionalne kationske nanoemulzije za liječenje bolesti suhog oka. U tu su svrhu pripravljena dva tipa nanoemulzija korištenjem mikrofluidizatora: primarne kationske nanoemulzije sa stearylaminom i sekundarne kationske nanoemulzije s kitozonom. Primarne kationske nanoemulzije s rastućim udjelima stearylamina male su veličine kapljica (< 100 nm), primjerene disperznosti ($PDI \leq 0,25$), pozitivnog zeta-potencijala (3,1-25,5 mV), prikladne pH vrijednosti, male viskoznosti i površinske napetosti $31,3$ - 35 mN m⁻¹. Pripravljene nanoemulzije stabilne su tijekom petomjesečne pohrane. Nakon miješanja s disperzijom mucina zapažene su promjene u veličini kapljica i zeta-potencijalu koje ukazuju na interakciju s mucinom. Takve promjene nisu bile izraženije s povećanjem udjela stearylamina na više od 0,05 % (m/m). Vijabilnost 3D HCE-T modela iznosila je najmanje 90 % nakon izlaganja pripremljenim formulacijama. Sekundarne kationske nanoemulzije pripravljene s manjim (NC1: 0,05 %, m/m) i većim (NC2: 0,3 %, m/m) udjelom kitozana veličine su kapljica približno 180 nm, veće homogenosti ($PDI < 0,2$) i pozitivnog zeta-potencijala (18,7 i 30 mV). Iako je formulacija NC1 pokazala bolju stabilnost, ibuprofen je uspješno uklobljen u obje formulacije (INC1 i INC2). Fizičko-kemijska svojstva (pH, viskoznost, osmolarnost i površinska napetost) pripremljenih formulacija unutar su raspona prikladnog za primjenu na oko. Formulacija INC1 stabilnija je od formulacije INC2 nakon jednomjesečne pohrane. Bakteriološka filtracija prikladna je metoda sterilizacije pripremljenih formulacija. Oslobođanje ibuprofena iz pripremljenih formulacija značajno je brže nego iz uljne otopine i suspenzije ibuprofena. Reološka karakterizacija formulacija pomiješanih s disperzijom mucina pokazala je njihov mukoadhezivni karakter koji, ipak, nije izraženiji kod formulacije INC2 s većim udjelom kitozana. Ispitivanja na 3D HCE-T modelu i *ex vivo* modelu rožnice svinje pokazala su izuzetnu biokompatibilnost INC1 formulacije. Uzimajući u obzir sve rezultate, nanoemulzija s 0,05 % (m/m) stearylamina i INC1 formulacija ističu se kao vodeće formulacije s velikim potencijalom za liječenje bolesti suhog oka.

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

Rad sadrži: 140 stranica, 24 grafička prikaza, 10 tablica i 177 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kationska nanoemulzija, bolest suhog oka, stearylamin, kitozan, lecitin, ibuprofen, 3D HCE-T model, rožnica svinje.

Mentor: **Dr. sc. Jasmina Lovrić**, redovita profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivan Pepić**, izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Biserka Cetina Čižmek, izvanredna profesorica, PLIVA Hrvatska d.o.o., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Dr. sc. Igor Petriček, docent, Klinički bolnički centar Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

Basic documentation card

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

Doctoral dissertation

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL CATIONIC NANOEMULSIONS FOR TREATMENT OF DRY EYE DISEASE

Bisera Jurišić Dukovski

SUMMARY

Dry eye disease is a multifactorial disease characterized by tear film instability and hyperosmolarity and ocular surface inflammation. Oil-in-water (O/W) cationic nanoemulsions represent a progress in dry eye disease treatment serving as a technological platform for incorporation of poorly soluble drugs, enabling prolonged residence time at the ocular surface and, at the same time, replenishment and stabilization of compromised tear film. The aim of this doctoral thesis is development of a functional cationic nanoemulsion for dry eye disease treatment. For this purpose two nanoemulsion types were prepared using microfluidizer: primary cationic nanoemulsions with stearylamine and secondary cationic nanoemulsions with chitosan. Primary cationic nanoemulsions with increasing stearylamine weight fraction are characterized with small droplet size (< 100 nm), low PDI (≤ 0.25), positive zeta-potential (3.1-25.5 mV), appropriate pH, low viscosity and surface tension 31.3-35 mN m⁻¹. The nanoemulsions are stable after 5-month storage. Changes in nanoemulsion droplet size and zeta-potential were observed after mixing with mucin dispersion, which indicates interactions with mucin. However, the changes were not more pronounced with the increase in stearylamine weight fraction above 0.05 % (w/w). Viability of 3D HCE-T model was at least 90 % after exposure to the prepared formulations. Secondary cationic nanoemulsions prepared with low (NC1: 0.05 %, w/w) and high (NC2: 0.3 %, w/w) chitosan weight fraction are characterized with droplet size of around 180 nm, greater homogeneity (PDI < 0.2) and positive zeta-potential (18.7 and 30 mV). Although the formulation NC1 showed greater stability, ibuprofen was successfully incorporated in both formulations (INC1 and INC2). The physico-chemical properties (pH, viscosity, osmolarity and surface tension) of the prepared formulations are within the range acceptable for ophthalmic application. The formulation INC1 is more stable than the formulation INC2 after 1-month storage. Filtration is an appropriate sterilization method for the prepared formulations. Ibuprofen release from the prepared formulations is significantly faster than from ibuprofen oil solution and suspension. Rheological characterization of the formulations mixed with mucin dispersion showed their mucoadhesive character which, however, is not more pronounced with the formulation INC2 with higher chitosan weight fraction. The assays performed using 3D HCE-T model and *ex vivo* porcine cornea model showed remarkable biocompatibility of the formulation INC1. Taking everything into account, the nanoemulsion with 0.05 % (w/w) stearylamine and INC1 formulation point out as the lead formulations holding great potential for the treatment of dry eye disease.

The dissertation is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Dissertation includes: 140 pages, 24 figures, 10 tables and 177 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cationic nanoemulsion, dry eye disease, stearylamine, chitosan, lecithin, ibuprofen, 3D HCE-T model, porcine cornea.

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

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

Biserka Cetina Čižmek, Ph.D., Associate Professor, PLIVA Croatia Ltd., Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Igor Petriček, Ph.D., Assistant Professor, University Hospital Centre Zagreb, School of Medicine, University of Zagreb.

Dissertation accepted: June 2020

PRILOG

Prilog sadrži dva originalna znanstvena rada objavljena u časopisima koji su zastupljeni u bazi *Web of Science Core Collection*, koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

Jurišić Dukovski, B., Bračko, A., Šare, M., Pepić, I., Lovrić, J. In vitro evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery. *Acta Pharmaceutica*, 2019; 69 (4): 621-634.

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. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020; 576: 118979.

***In vitro* evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery**

BISERA JURJIŠIĆ DUKOVSKI
ANA BRAČKO
MARIJA ŠARE
IVAN PEPIC
JASMINA LOVRIC*

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, HR-10000 Zagreb, Croatia

Oil-in-water nanoemulsions (NEs) represent one of the formulation approaches to improve eye-related bioavailability of lipophilic drugs. The potential of cationic NEs is pronounced due to the electrostatic interaction of positively charged droplets with negatively charged mucins present in the tear film, providing prolonged formulation residence at the ocular surface. The aim of this study was to develop a cationic ophthalmic NE with cationic lipid stearylamine (SA) as a carrier of a positive charge. The addition of a nonionic surfactant provided the dual electro-steric stabilization of NEs and enabled tuning of SA concentration to achieve an optimal balance between its interaction with mucins and biocompatibility. Physicochemical characterization, stability profile, *in vitro* mucoadhesion study and biocompatibility study employing 3D HCE-T cell-based model of corneal epithelium pointed out the NE with 0.05 % (*m/m*) SA as the leading formulation. Minimizing SA content while retaining droplet/mucin interactions is of great importance for efficacy and safety of future ophthalmic drug products.

Keywords: cationic nanoemulsions, stearylamine, ophthalmic drug delivery, biocompatibility, mucoadhesion *in vitro*

Accepted July 10, 2019

Published online September 9, 2019

Ophthalmic diseases are most commonly treated by topical instillation of eye-drops. The conventional eye-drops are quite simple dosage forms and are well accepted by patients. However, they often raise technical issues, such as solubility, stability and sterility, and clinical issues due to short residence time at the ocular surface and consequent low bioavailability. A significant number of ophthalmic drugs are lipophilic molecules and it is, therefore, challenging to formulate them in the form of conventional eye-drops. Oil-in-water (o/w) nanoemulsions (NEs) represent one of the formulation approaches to improve ocular bioavailability of lipophilic drugs. Lipophilic drug molecules can be solubilized at the innermost oil phase or at the o/w interface of a NE (1) and the nanometric size of the

* Correspondence; e-mail: jlovric@pharma.hr

oil droplets gives rise to a large surface area available for drug diffusion (2). It is believed that after instillation NE breakdown occurs (due to the composition of tears and blinking) which is followed by the release of drug molecules and fusion of the NE oil phase with tear film lipid layer (TFLL). Since TFLL has a much slower turnover rate than tears, the unreleased drug portion remains in the conjunctival sac for a longer time, acting as a drug depot (3). Such NE behavior is especially beneficial for dry eye disease treatment where TFLL is often compromised and NEs can replenish not only the aqueous phase, but also the lipid phase of the tear film (3). A pilot study on 15 volunteers (5 normal and 10 with dry eye symptoms) showed that 4 hours after a single eye-drop instillation of a castor oil NE, castor oil could still be detected in tears (4). Furthermore, NE droplet surface can be modified with cationic lipids or polymers to form positively charged oil droplets. Such cationic NEs have the potential to electrostatically bind to negatively charged ocular surface cells and mucin chains and hence prolong drug residence (2, 3). Stearylamine (SA) is a cationic lipid with surface active properties commonly used to produce positively charged liposomes (5) or emulsions (6–8) and it was found to be safe and well tolerated in rabbits after repeated topical ophthalmic administrations (8). Among positively charged polymers chitosan is most commonly used as a NE cationic agent (3), due to its biocompatibility, biodegradability and mucoadhesion (9). The choice of ophthalmically acceptable excipients (*i.e.* oils, surfactants, cationic lipids or polymers, isotonicizing agent) is of utmost importance for successful development of a stable and functional NE formulation rendering the potential to prolong precorneal residence time and improve bioavailability, which is at the same time non-irritant, well-tolerated and comfortable for patients. That is why a deep physicochemical characterization (including measurement of droplets size, size distribution, zeta-potential, pH, osmolarity, surface tension and viscosity) and biopharmaceutical characterization (including *in vitro* mucoadhesion and biocompatibility) are crucial for the success.

The aim of this work was the development of a cationic NE, that could serve as a vehicle for lipophilic ophthalmic drugs. SA was used as a droplet positive charge inducer providing the interaction of droplets with the ocular mucins and positively influencing NE stability. Nonionic surfactants were selected in order to provide, together with SA, dual electro-steric stabilization of NEs, and therefore enable tuning of SA concentration according to its interaction with mucins and biocompatibility. Therefore, physicochemical and biopharmaceutical characterizations, including *in vitro* mucoadhesion and biocompatibility, were performed to choose the lead NE formulation with the greatest potential for further studies.

EXPERIMENTAL

Chemicals

For NE preparation the following substances were used: castor oil, virgin (Kemig, Croatia), Miglyol[®] 812 (Kemig), sesame oil, super refined (Croda International Pic, United Kingdom), soybean oil, refined (Sigma-Aldrich, Germany), Cremophor[®] EL (BASF, Germany), Pluronic[®] F68 (Sigma-Aldrich), Tween[®] 60 (Sigma-Aldrich), Tween[®] 80 (Kemig), glycerol (T.T.T., Croatia) and stearylamine (Sigma-Aldrich). MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) purchased from AppliChem (Germany) was

used to determine cell viability in *in vitro* biocompatibility study. Porcine gastric mucin type II (Sigma-Aldrich) was used for *in vitro* study of mucoadhesion. Hank's balanced salt solution (HBSS) pH 7.4 was prepared as an aqueous solution containing: KCl (5.37 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (4.17 mmol L⁻¹), NaCl (136.89 mmol L⁻¹), MgSO₄×7H₂O (0.41 mmol L⁻¹), D-glucose monohydrate (5.55 mmol L⁻¹) (all purchased from Kemig), KH₂PO₄ (0.44 mmol L⁻¹; Kemika, Croatia), Na₂HPO₄×2H₂O (0.34 mmol L⁻¹; Fluka Chemie AG, Switzerland), MgCl₂×6H₂O (0.49 mmol L⁻¹; Merck, Germany), CaCl₂×2H₂O (1.26 mmol L⁻¹; Sigma-Aldrich) and HEPES (30.00 mmol L⁻¹; AppliChem). Simulated tear fluid (STF) pH 7.4 was prepared as an aqueous solution containing: KCl (18.78 mmol L⁻¹), NaCl (116.35 mmol L⁻¹), NaHCO₃ (26.19 mmol L⁻¹) and CaCl₂×2H₂O (0.54 mmol L⁻¹).

NE preparation

NEs within this work were produced by a high-energy method using microfluidizer (Model M-110EH-30, Microfluidics®, USA). NEs without SA were prepared by the addition of oil (5 %, *m/m*) to the aqueous surfactant solution (0.5–5 %, *m/m*) at room temperature under magnetic stirring (Table I). The mixture was then pre-homogenized on Ultra-Turax® (IKA-Werke GmbH & Company, Germany) during 5 minutes at 6000 rpm and the obtained coarse emulsion was further processed on microfluidizer under the pressure of 1000 bar and 10 cycles. To prepare NEs with SA (SANEs), SA (0.01–0.3 %, *m/m*) was dissolved in Miglyol® 812 (5 %, *m/m*) by heating to 70 °C. The aqueous solution of Cremophor® EL (2.5 %, *m/m*) and glycerol (2.5 %, *m/m*) preheated to the same temperature was added to the oil phase under magnetic stirring and the rest of the procedure was done as for the NEs without SA.

Physicochemical characterization and stability testing

Droplet size, polydispersity index (PDI) and zeta-potential of NEs were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) using Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, United Kingdom) at 25 °C. For that purpose, NE samples were diluted 100× (*V/V*) with double distilled water (droplet size and PDI) and 10 mM NaCl solution (zeta-potential), respectively. pH was measured on a Seven Multi pH/conductometer (Mettler Toledo, USA) at 25 °C. NE viscosity was measured using MCR 102 rheometer (Anton Paar, Austria) equipped with a cone-plate measuring device (CP 50-1, trim position 102 µm) over a shear rate range 1–100 s⁻¹ at 25 °C. The viscosity of oils was determined by employing the same method. Surface tension measurements were performed on Krüss K-100C tensiometer (Germany), employing the Du Noüy ring method. All measurements were performed at 25 °C using a water-circulating bath with temperature stability within 0.02 °C. For stability testing purposes droplet size, PDI, zeta-potential and pH were measured as described after 30 and 150-day storage period at 4 °C.

In vitro biocompatibility study

In vitro biocompatibility study was performed using HCE-T cells (RIKEN Cell Bank, Japan). The cells were cultivated as reported previously (11, 12). For *in vitro* biocompatibility studies two types of cell models were employed, namely 2D and 3D HCE-T cell models. For cultivations of the 2D model, HCE-T cells suspended in supplemented DMEM/F-12

medium were seeded onto a 96-well plate (1×10^4 cells per well) and grown until reaching confluence. The culture medium was then aspirated and the cells were rinsed with HBSS (approximately 100 μ L per well). The cells were then exposed to NE diluted 10 \times (V/V) in HBSS, as previously described (13), during 30 minutes at 37 °C. The NE samples were then removed, the cells were rinsed with HBSS (approximately 100 μ L per well), the culture medium was added (100 μ L per well) and the cells were left in the incubator until the following day when MTT assay was performed. MTT was dissolved in phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) to obtain a 6 mM solution and 20 μ L of such solution were added to each well. The cells were then incubated during 3 hours at 37 °C, after which the medium was aspirated and 100 μ L of isopropanol was added to each well in order to dissolve the formazan crystals. The absorbance of the formazan solution was measured at 570 nm with a microplate reader (1420 Multilabel counter VICTOR³, Perkin Elmer, USA). The cells incubated in HBSS were used as a control of 100 % cell viability.

For cultivation of the 3D HCE-T model, Transwell[®] polycarbonate membrane cell culture inserts (0.4 μ m pore size, 12 mm diameter, surface area 1.12 cm², Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands) were used. The 3D HCE-T model was cultivated as reported previously (11, 12). Before treatment with the NE samples, the culture medium was aspirated from the basolateral side and the inserts were washed with HBSS. The inserts were then transferred to a new 12-well cell culture plate (Corning B.V. Life Sciences) and incubated during 30 minutes in HBSS (0.5 mL apical side/1.5 mL basolateral side) at 37 °C. After incubation, HBSS from the apical side was removed and 0.5 mL of NE sample diluted 10 \times (V/V) in HBSS, as previously described (13), was added instead and the model was incubated during 30 minutes at 37 °C. After incubation, the test samples were removed from the apical side and the inserts were washed with HBSS, after which the inserts were transferred to a new 12-well plate with a metal plate containing 2 mL of cell culture medium in the basolateral side, while the apical side was exposed to the air-liquid interface (ALI) overnight. MTT assay was performed according to the protocol previously reported (11, 14). Briefly, after removing the cell culture medium, 0.7 mL of MTT solution in the cell culture medium (1.2 mM) was added to both apical and basolateral compartment and the model was incubated during 3 hours at 37 °C. After removing the MTT solution, formazan crystals were dissolved in isopropanol (0.7 mL in both apical and basolateral compartment) and the absorbance was determined as described for 2D HCE-T cell model above.

In vitro mucoadhesion study

For a better understanding of NE interaction with mucin an *in vitro* study was performed as described by Pereira de Sousa *et al.* (15) with some modifications. Briefly, 1 % (m/m) mucin dispersion in STF was prepared by overnight stirring at room temperature. NEs were mixed with the mucin dispersion in 40:7 (V/V) ratio and left under magnetic stirring at 300 rpm during 20 minutes at room temperature. Samples were taken at 5 and 20 minutes and droplet size and zeta-potential were measured as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

NE technology has an increasing influence in every aspect of drug delivery (16–18), particularly in ophthalmic drug delivery (2, 19). Physicochemical properties affecting *in*

in vivo performance of an ophthalmic NE include droplet size, size distribution and zeta-potential, formulation viscosity profile as a function of applied shear, pH, osmolarity, and surface tension (20, 21). In order to develop a stable cationic NE with SA as a carrier of positive charge, we first performed screening of ophthalmically acceptable oils and non-ionic surfactants in search for primary formulation with small droplet size and low PDI value.

Screening of oils and nonionic surfactants for NE preparation

Four different types of oils (castor oil, Miglyol® 812, sesame oil and soybean oil) and surfactants (Cremophor® EL, Pluronic® F68, Tween® 60 and Tween® 80) were used to produce NEs using microfluidizer (Table I). While the oil concentration was fixed at 5 % (*m/m*), since higher oil concentrations tend to cause blurred vision when NEs are applied to the eye (1), the surfactant concentration varied between 0.5 and 5 % (*m/m*). As can be seen from Table I, the oil type had a significant influence on the NE droplet size, which could be ascribed to the difference in the oil viscosity. It was already stated that higher viscosities lead to flow resistance in the chamber of a microfluidizer which reduces the rate and efficiency of droplet disruption, resulting in larger droplet formation (22). The viscosity values measured for castor oil, Miglyol® 812, sesame and soybean oil were 704.37 ± 14.85 , 22.91 ± 0.05 , 55.89 ± 0.13 and 54.91 ± 0.21 mPa s, respectively. Thus, the largest droplets were obtained with castor oil, which had the highest viscosity, and the smallest droplets were produced with Miglyol® 812, which had the lowest viscosity. Since smaller oil droplet size contributes to the NE stability and also leads to an increase in the total surface area available for drug diffusion (2), Miglyol® 812 was chosen as the oil phase for further studies. While the type of nonionic surfactants did not seem to have a strong impact on the droplet size, the increase in the surfactant concentration had a significant influence on the droplet size reduction, as already reported elsewhere (23, 24). This can be explained by the fact that an excess of surfactant in the bulk NE outer phase is available to cover any new droplet surface formed during homogenization and by the fact that the droplet surface is covered more rapidly (24). Also, lowering the interfacial tension through the use of surfactants may facilitate droplet disruption and formation of smaller droplets (25). Zeta-potential of all the NEs produced was close to zero or slightly negative, probably due to the preferential adsorption of OH⁻ ions on the droplet surface, as explained elsewhere (26). From all the NEs prepared the NE formulation with 5 % (*m/m*) of Miglyol® 812 and 2.5 % (*m/m*) of Cremophor® EL was chosen for further studies because it had the lowest droplet size among the NE formulations with PDI value lower than 0.2.

Preparation and physicochemical characterization of cationic stearylamine NEs (SANEs)

After selecting the primary formulation stabilized with nonionic surfactant only, the selection of SA concentration for SANE preparation was performed. A total of 4 NE formulations of Miglyol® 812 (5 %, *m/m*), Cremophor® EL (2.5 %, *m/m*) and SA (0.01, 0.05, 0.1 and 0.3 %, *m/m*) with glycerol as a tonicity agent (2.5 %, *m/m*) were prepared (Table II) and a detailed physicochemical characterization was performed. The obtained SANEs were highly fluid and homogenous with milky-white appearance with osmolarity in the physiological range of tear film. All SANE formulations were characterized by small droplet size (81.03 to 95.6 nm) and appropriate PDI (0.139 to 0.251) with droplet size and PDI increasing

Table I. Droplet size, polydispersity index (PDI) and zeta-potential of nanoemulsions prepared with different oil type, surfactant type and surfactant concentration

Oil type	Surfactant type	Surfactant concentration (%)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	
Castor oil	Cremophor® EL	0.5	374.8 ± 1.6	0.205 ± 0.051	-11.2 ± 0.5	
		1	281.0 ± 2.8	0.270 ± 0.038	-8.6 ± 0.7	
		2.5	231.1 ± 3.3	0.448 ± 0.119	-7.2 ± 0.4	
		5	212.5 ± 2.7	0.419 ± 0.006	-6.7 ± 0.5	
	Pluronic® F68	0.5	407.6 ± 3.6	0.315 ± 0.054	-12.2 ± 0.9	
		1	340.9 ± 2.2	0.268 ± 0.058	-9.9 ± 0.9	
		2.5	258.3 ± 2.5	0.212 ± 0.034	-6.0 ± 0.7	
		5	223.5 ± 3.9	0.268 ± 0.021	-5.0 ± 0.4	
	Tween® 60	Tween® 60	0.5	458.0 ± 2.8	0.100 ± 0.071	-7.5 ± 0.7
			1	380.9 ± 4.2	0.235 ± 0.075	-5.9 ± 0.1
			2.5	275.5 ± 3.0	0.238 ± 0.026	-5.5 ± 0.1
			5	227.6 ± 4.2	0.323 ± 0.048	-5.0 ± 0.3
Tween® 80		0.5	448.7 ± 11.4	0.250 ± 0.247	-8.6 ± 0.4	
		1	367.7 ± 3.0	0.274 ± 0.069	-3.1 ± 0.5	
		2.5	282.0 ± 3.7	0.233 ± 0.018	-2.5 ± 0.6	
		5	238.5 ± 1.7	0.351 ± 0.069	-2.2 ± 0.2	
Miglyol® 812	Cremophor® EL	0.5	205.3 ± 2.1	0.089 ± 0.007	-7.0 ± 0.7	
		1	158.7 ± 2.5	0.093 ± 0.020	-4.5 ± 0.5	
		2.5	98.5 ± 0.7	0.160 ± 0.007	-4.3 ± 0.7	
		5	65.1 ± 0.7	0.216 ± 0.002	-2.2 ± 0.5	
	Pluronic® F68	0.5	225.5 ± 1.4	0.135 ± 0.019	-1.3 ± 0.3	
		1	190.8 ± 1.8	0.134 ± 0.008	-1.3 ± 0.5	
		2.5	137.9 ± 0.7	0.143 ± 0.012	-1.9 ± 0.6	
		5	95.9 ± 0.6	0.171 ± 0.023	-1.3 ± 0.3	
	Tween® 60	Tween® 60	0.5	197.3 ± 2.4	0.115 ± 0.031	-14.1 ± 0.6
			1	160.6 ± 1.4	0.144 ± 0.010	-12.3 ± 0.6
			2.5	114.7 ± 1.5	0.289 ± 0.030	-11.0 ± 0.6
			5	79.5 ± 0.7	0.348 ± 0.024	-8.2 ± 0.5
Tween® 80		0.5	196.3 ± 1.1	0.131 ± 0.005	-10.7 ± 0.5	
		1	154.6 ± 1.3	0.184 ± 0.027	-6.0 ± 0.5	
		2.5	108.5 ± 0.5	0.286 ± 0.020	-2.2 ± 0.6	
		5	78.2 ± 0.7	0.361 ± 0.046	-1.4 ± 0.8	

Table I. Continued

Sesame oil	Cremophor® EL	0.5	247.6 ± 3.9	0.093 ± 0.039	-2.9 ± 0.6
		1	198.5 ± 3.0	0.134 ± 0.016	-2.5 ± 0.4
		2.5	132.2 ± 1.9	0.271 ± 0.023	-2.3 ± 0.7
		5	92.7 ± 0.8	0.371 ± 0.030	-1.9 ± 0.6
	Pluronic® F68	0.5	257.9 ± 4.5	0.140 ± 0.080	-2.2 ± 0.5
		1	231.2 ± 4.6	0.114 ± 0.031	-1.9 ± 0.5
		2.5	182.2 ± 2.7	0.188 ± 0.030	-1.0 ± 0.2
		5	146.6 ± 4.3	0.245 ± 0.113	-0.9 ± 0.9
	Tween® 60	0.5	243.1 ± 6.1	0.016 ± 0.016	-5.4 ± 0.5
		1	205.4 ± 2.7	0.108 ± 0.052	-7.3 ± 0.6
		2.5	143.6 ± 3.9	0.222 ± 0.002	-6.1 ± 0.4
		5	86.8 ± 1.8	0.349 ± 0.034	-6.2 ± 0.6
Tween® 80	0.5	233.8 ± 2.7	0.099 ± 0.032	-3.2 ± 0.5	
	1	193.5 ± 3.2	0.105 ± 0.008	-2.3 ± 0.5	
	2.5	138.3 ± 2.4	0.199 ± 0.020	-2.9 ± 0.5	
	5	93.0 ± 2.1	0.340 ± 0.028	-2.7 ± 0.5	
Soybean oil	Cremophor® EL	0.5	236.2 ± 3.3	0.148 ± 0.090	-7.1 ± 0.2
		1	190.8 ± 3.1	0.097 ± 0.036	-5.2 ± 0.7
		2.5	118.4 ± 2.4	0.181 ± 0.019	-4.2 ± 0.8
		5	87.8 ± 1.3	0.383 ± 0.011	-3.7 ± 0.3
	Pluronic® F68	0.5	253.7 ± 6.3	0.124 ± 0.006	-4.4 ± 0.3
		1	229.1 ± 6.2	0.121 ± 0.033	-3.4 ± 0.5
		2.5	179.9 ± 4.4	0.050 ± 0.040	-2.8 ± 0.5
		5	145.4 ± 2.4	0.212 ± 0.045	-3.6 ± 1.2
	Tween® 60	0.5	238.3 ± 3.8	0.127 ± 0.022	-6.4 ± 0.4
		1	195.6 ± 2.8	0.167 ± 0.003	-5.2 ± 0.3
		2.5	115.3 ± 1.3	0.336 ± 0.039	-5.5 ± 0.4
		5	83.8 ± 0.9	0.429 ± 0.049	-5.5 ± 0.3
Tween® 80	0.5	245.1 ± 5.9	0.076 ± 0.055	-9.0 ± 0.3	
	1	205.9 ± 5.1	0.131 ± 0.021	-4.0 ± 0.6	
	2.5	149.2 ± 3.8	0.231 ± 0.007	-1.6 ± 0.2	
	5	99.8 ± 2.4	0.314 ± 0.017	-0.9 ± 0.8	

Mean ± SD, *n* = 2

with the increase of SA concentration (Table II). As expected, zeta-potential also increased from 3.1 to 25.5 mV with the SA concentration increase from 0.01 to 0.3 % (*m/m*). Zeta-potential of droplets influences formulation precorneal residence and stability at the ocular surface as well as formulation stability during storage. For all SANE formulations, pH was in the range acceptable for ophthalmic administration. SANE formulations behaved as Newtonian systems and their viscosity, as determined by rotational rheological characterization, was in the range similar to the viscosity of water with a slight increase with the increase in SA concentration. Low formulation viscosity enables dosing accuracy and ease of eye-drop administration. Surface tension is an important physicochemical formulation parameter that determines spreading of a formulation across the ocular surface and also influences capillary drainage through the nasolacrimal ducts, affecting precorneal residence time of the instilled formulation (20). As expected, with the increase in cationic surfactant concentration, the surface tension of SANE formulation decreased. The surface tension of the tear film has a physiological range of 40–46 mN/m (27, 28). Generally, higher surface tension values correspond to lower tear film stability, as it is the case in dry eye disease, where a surface tension range of 44–53 mN m⁻¹ has been reported (29, 30). The surface tension of an ophthalmic formulation should be close to 35 mN m⁻¹, since there are indications that the administration of formulations with lower surface tension may be painful and uncomfortable (30, 31).

Physical stability of SANE formulations was followed during 150-day storage at 4 °C. The formulations did not show any difference in their visual appearance, *i.e.* no creaming or phase separation was observed. The PCS analyses confirmed that during the storage period, the droplets stayed in the nanometer range (< 100 nm) with only a minor size increase (~10 nm), no significant changes in droplet size distribution (PDI < 0.25) nor zeta-potential (Fig. 1), proving therefore a satisfactory formulation stability. As a rule of thumb, droplet zeta-potential either above 30 mV or below -30 mV is considered a good indicator of long-term stability of a charged NE (16). The satisfactory formulation physical stability of the investigated SANE formulations, therefore, confirms an effective dual electro-steric stabilization. As an indicator of chemical stability, the pH value was also determined. In all the formulations a decrease in pH was observed, however, pH values stayed in the ophthalmically acceptable range (6.07–8.45).

Table II. Droplet size, polydispersity index (PDI), zeta-potential, pH, viscosity and surface tension of nanoemulsions with different stearylamine (SA) concentration

SA (%)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	pH	Viscosity (mPa s)	Surface tension (mN m ⁻¹)
0	81.2 ± 0.4	0.110 ± 0.007	-2.0 ± 0.5	6.76 ± 0.12	1.32 ± 0.01	34.53 ± 1.16
0.01	81.03 ± 0.4	0.139 ± 0.017	3.1 ± 0.5	6.82 ± 0.14	1.40 ± 0.02	34.98 ± 0.38
0.05	86.0 ± 0.4	0.228 ± 0.005	13.2 ± 1.2	7.03 ± 0.12	1.71 ± 0.07	34.57 ± 0.37
0.1	89.9 ± 0.5	0.236 ± 0.005	20.3 ± 1.3	7.78 ± 0.19	3.31 ± 0.32	32.67 ± 0.62
0.3	95.6 ± 2.8	0.251 ± 0.012	25.5 ± 2.15	8.69 ± 0.31	2.80 ± 0.30	31.29 ± 1.02

Mean ± SD, *n* = 2

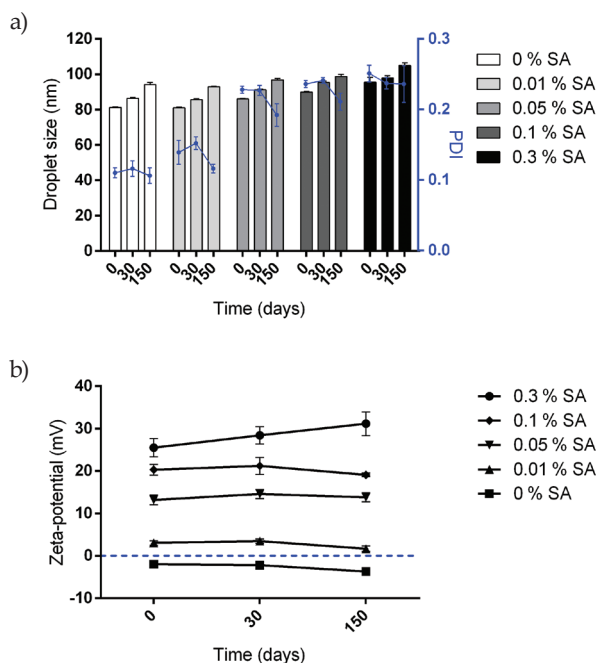


Fig. 1. a) Droplet size and polydispersity index (PDI), b) zeta-potential of SANE formulations measured at day 0, 30 and 150. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 2$). NE without SA (0 %) is plotted as control formulation.

In vitro biocompatibility determination

The most extensively characterized human-derived cell line used in corneal biocompatibility and transcorneal permeability studies is the immortalized human corneal epithelial cell line (HCE-T) (11). The majority of *in vitro* biocompatibility screenings is currently undertaken using cells cultured in a two-dimensional (2D) environment (32). However, this does not accurately reflect the three dimensional (3D) structure of the corneal epithelium. The use of inadequate experimental tools can lead to wrong conclusions about formulation biocompatibility. Therefore, SANE formulation biocompatibility was screened using both 2D and 3D HCE-T cell-based model. As shown in Fig. 2, cell viability in the 2D HCE-T model was severely affected in the presence of formulations, and the negative formulation effect on cell viability increased in relation to SA content. However, SANE formulations in the same concentration irrespective to SA content were found to be biocompatible with the 3D HCE-T cell-based model.

In vitro mucoadhesion determination

Beneficial effects of NEs on eye-related bioavailability will depend on the residence time of a formulation at the ocular surface. SA, as a cationic surfactant, has the potential to interact with mucins present in the tear fluid. Mucins are high-molecular-mass glycopro-

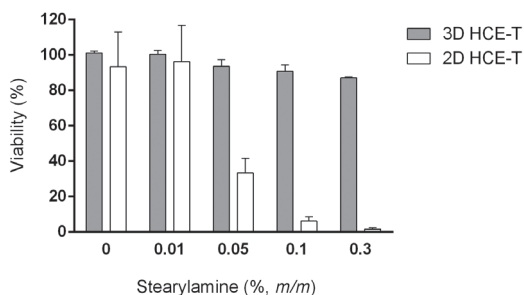


Fig. 2. 3D ($n = 2$) and 2D ($n = 5$) HCE-T model viability (%) determined by MTT assay after 30-minute incubation with NE diluted 10 times with HBSS pH 7.4. Cells incubated in HBSS only were used as a control of 100 % cell viability. Data are expressed as mean \pm SD.

teins with polysaccharide side chains usually terminated with either fucose or sialic acid, which makes them negatively charged at physiological pH (33). In order to determine mucoadhesion potential of SANE formulations, we investigated the electrostatic interactions occurring between SANE droplets and diluted mucins by adapting the method developed by Bernkop-Schnürch group (15) to mimic the conditions at the ocular surface. More precisely, SANE formulations were mixed with 1 % (m/m) mucin dispersion in STF in 40:7 (V/V) ratio and the mucin-droplet interaction was followed during 20 minutes (Fig. 3). This ratio was based on the approximate volumes of an eye-drop (40 μL) and a tear film (7 μL) (34, 35). In a short time period after eye-drop instillation, positively charged oil droplets should electrostatically interact with negatively charged mucins in order to decrease their clearance from the ocular surface. This droplet/mucin interaction should be detectable *in vitro* by an increase in droplet size and a decrease in droplet zeta-potential. This innovative *in vitro* method for determination of NE mucoadhesive properties was used as an alternative to the most frequently used *in vitro* methods, such as tensile strength and rheological method (36). Tensile strength has been the most extensively used *in vitro* method for the determination of bioadhesive interactions and it can be performed on solid and semisolid materials or formulations. Besides the need to adjust certain parameters (force, contact time and withdrawal speed) depending on the tested sample and consequent incomparability of the results obtained among distinct samples (36), this method is not appropriate for liquid samples, and was thus not used within this study. Another commonly used *in vitro* method is the rheological method, which can detect interactions between mucin and polymers in terms of viscosity increase due to synergism (36, 37). However, due to the fact that our NE formulations did not contain any polymeric material, this rheological method was also not a good choice, since it could underestimate NE mucoadhesive properties and give inconsistent and confusing results. The innovative *in vitro* method used within this study is appropriate for liquid samples containing positively charged nanomaterial. However, it could not be used to test mucoadhesion of solid or semisolid formulations, nor formulations that base their mucoadhesive properties on mechanisms other than electrostatic interaction. *In vivo* studies, that are usually based on measurement of formulation residence time on the ocular surface, are needed to confirm the results obtained by *in vitro* methods, even though such methods do not provide an insight in the mucoadhesion mechanism (36).

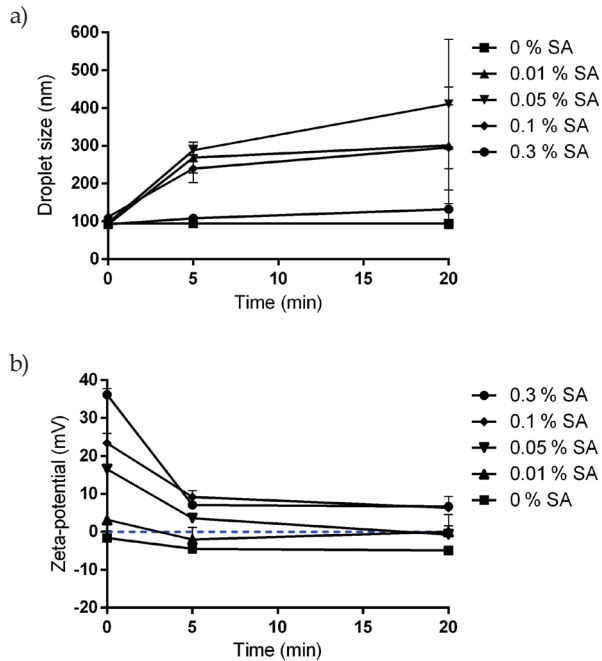


Fig. 3. a) Droplet size and b) zeta-potential of nanoemulsions measured before and 5 and 20 minutes after mixing with 1 % (*m/m*) mucin dispersion in STF in 40:7 (*V/V*) ratio. NE without SA (0 %) was used as control formulation. Data are expressed as mean \pm SD.

A drastic change in studied physicochemical parameters was observed immediately 5 minutes after mixing SANE formulations with mucins (Fig. 3). The droplets reached a size above 200 nm for SANE formulations with SA content up to 0.1 %. Interestingly, the droplet size increase was not observed for the formulation with the highest SA content. Droplet zeta-potential decreased significantly for all SANE formulations. The NE formulation without SA was used as a negative control and no significant change in studied physicochemical parameters was observed throughout the whole test period. Therefore, the change in size and zeta-potential detected can be ascribed to droplet/mucin interaction mediated by SA positively charged groups at the droplet interface.

CONCLUSIONS

Physicochemical parameters (droplet size < 100 nm, PDI < 0.25, zeta-potential \sim 13 mV, pH \sim 7, surface tension \sim 35 mN m^{-1}) and stability profile pointed out SANE formulation with 0.05 % SA as the leading formulation. This was confirmed in *in vitro* mucoadhesion study where substantial droplet/mucin interaction was determined for the mentioned SANE formulation. The selected formulation was also found to be biocompatible with the 3D HCE-T cell-based model of corneal epithelium. Minimizing SA content while retaining droplet/mucin interactions is of great importance for efficacy and safety of future ophthalmic drug products.

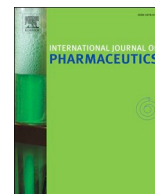
Acknowledgments. – The authors are grateful to R&D PLIVA Croatia Ltd. for generously providing the use of Microfluidics® microfluidizer. The authors also acknowledge the participation of students Matea Krpan and Glorija Parmać in the screening of oils and nonionic surfactants for NE preparation. This work was supported by the project entitled Topical nanodelivery systems funded by the University of Zagreb (Z169).

REFERENCES

1. S. Tamilvanan and S. Benita, The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58** (2004) 357–368; <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2004.03.033>
2. F. Lallemand, P. Daull, S. Benita, R. Buggage and J.-S. Garrigue, Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, Novasorb, *J. Drug Deliv.* **2012** (2012) 604204; <https://doi.org/10.1155/2012/604204>
3. L. Gan, J. Wang, M. Jiang, H. Bartlett, D. Ouyang, F. Eperjesi, J. Liu and Y. Gan, Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers, *Drug Discov. Today* **18** (2013) 290–297; <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2012.10.005>
4. C. Maïssa, M. Guillon, P. Simmons and J. Vehige, Effect of castor oil emulsion eyedrops on tear film composition and stability, *Contact Lens Anterior Eye* **33** (2010) 76–82; <https://doi.org/10.1016/j.clae.2009.10.005>
5. A. Manosroi, K. Podjanasoonthon and J. Manosroi, Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations, *Int. J. Pharm.* **235** (2002) 61–70; [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00980-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00980-2)
6. S. C. de Araújo, A. C. A. de Mattos, H. F. Teixeira, P. M. Z. Coelho, D. L. Nelson and M. C. de Oliveira, Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions, *Int. J. Pharm.* **337** (2007) 307–315; <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2007.01.009>
7. M. Fraga, M. Laux, B. Zandoná, G. R. Santos, C. dos Santos Giuberti, M. C. de Oliveira, U. Matte and H. Ferreira Teixeira, Optimization of stearylamine-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification process as nucleic acids delivery systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **18** (2008) 398–403; [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(08\)50078-5](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(08)50078-5)
8. S. H. Klang, J. Frucht-Pery, A. Hoffman and S. Benita, Physicochemical characterization and acute toxicity evaluation of a positively-charged submicron emulsion vehicle, *J. Pharm. Pharmacol.* **46** (1994) 986–993; <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03254.x>
9. I. A. Sogias, A. C. Williams and V. V. Khutoryanskiy, Why is chitosan mucoadhesive?, *Biomacromolecules* **9** (2008) 1837–1842; <https://doi.org/10.1021/bm800276d>
10. W. T. Liau and A. M. Kasko, Poly(methyl 6-acryloyl- β -D-glucosaminoside) as a cationic glycomimetic of chitosan, *Biomacromolecules* **18** (2017) 4133–4140; <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01191>
11. M. Juretić, B. Jurišić Dukovski, I. Krtalić, S. Reichl, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, J. Lovrić and I. Pepić, HCE-T cell-based permeability model: A well-maintained or a highly variable barrier phenotype?, *Eur. J. Pharm. Sci.* **104** (2017) 23–30; <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.03.018>
12. M. Juretić, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, A. Hafner, J. Lovrić and I. Pepić, Biopharmaceutical evaluation of surface active ophthalmic excipients using *in vitro* and *ex vivo* corneal models, *Eur. J. Pharm. Sci.* **120** (2018) 133–141; <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2018.04.032>
13. K. Kinnunen, A. Kauppinen, N. Piippo, A. Koistinen, E. Toropainen and K. Kaarniranta, Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures, *Exp. Eye Res.* **120** (2014) 82–89; <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2014.01.006>
14. A. Pauly, M. Meloni, F. Brignole-Baudouin, J.-M. Warnet and C. Baudouin, Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: Early detection of toxic damage, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50** (2009) 1644–1652; Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-2992>

15. I. Pereira de Sousa, C. Steiner, M. Schmutzler, M. D. Wilcox, G. J. Veldhuis, J. P. Pearson, C. W. Huck, W. Salvenmoser and A. Bernkop-Schnürch, Mucus permeating carriers: formulation and characterization of highly densely charged nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **97** (2015) 273–279; <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.024>
16. Y. Singh, J. G. Meher, K. Raval, F. A. Khan, M. Chaurasia, N. K. Jain and M. K. Chourasia, Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *J. Control. Release* **252** (2017) 28–49; <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
17. V. K. Rai, N. Mishra, K. S. Yadav and N. P. Yadav, Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications, *J. Control. Release* **270** (2018) 203–225; <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
18. S. M. Đorđević, A. Santrač, N. D. Cekić, B. D. Marković, B. Divović, T. M. Ilić, M. M. Savić and S. D. Savić, Parenteral nanoemulsions of risperidone for enhanced brain delivery in acute psychosis: Physicochemical and in vivo performances, *Int. J. Pharm.* **533** (2017) 421–430; <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.051>
19. L. Gan, J. Wang, M. Jiang, H. Bartlett, D. Ouyang, F. Eperjesi, J. Liu and Y. Gan, Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers, *Drug Discov. Today* **18** (2013) 290–297; <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.005>
20. R. L. Walenga, A. H. Babiskin, X. Zhang, M. Absar, L. Zhao and R. A. Lionberger, Impact of Vehicle Physicochemical Properties on Modeling-Based Predictions of Cyclosporine Ophthalmic Emulsion Bioavailability and Tear Film Breakup Time, *J. Pharm. Sci.* **108** (2019) 620–629; <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.034>
21. H. Qu, J. Wang, Y. Wu, J. Zheng, Y. S. R. Krishnaiah, M. Absar, S. Choi, M. Ashraf, C. N. Cruz and X. Xu, Asymmetric flow field flow fractionation for the characterization of globule size distribution in complex formulations: A cyclosporine ophthalmic emulsion case, *Int. J. Pharm.* **538** (2018) 215–222; <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.012>
22. T. J. Wooster, M. Golding and P. Sanguansri, Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability, *Langmuir* **24** (2008) 12758–12765; <https://doi.org/10.1021/la801685v>
23. S. Uluata, E. A. Decker and D. J. McClements, Optimization of Nanoemulsion Fabrication Using Microfluidization: Role of Surfactant Concentration on Formation and Stability, *Food Biophys.* **11** (2016) 52–59; <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9416-1>
24. H. D. Silva, M. A. Cerqueira and A. A. Vicente, Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions, *J. Food Eng.* **167** (2015) 89–98; <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.037>
25. S. Brösel and H. Schubert, Investigations on the role of surfactants in mechanical emulsification using a high-pressure homogenizer with an orifice valve, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **38** (1999) 533–540; [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00050-1)
26. J.-P. Hsu and A. Nacu, Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant, *J. Colloid Interface Sci.* **259** (2003) 374–381; [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00207-2)
27. J. M. Tiffany, N. Winter and G. Bliss, Tear film stability and tear surface tension, *Curr. Eye Res.* **8** (1989) 507–515; <https://doi.org/10.3109/02713688909000031>
28. B. Nagyová and J. M. Tiffany, Components responsible for the surface tension of human tears, *Curr. Eye Res.* **19** (1999) 4–11; <https://doi.org/10.1076/ceyr.19.1.4.5341>
29. A. Puinhas, P. Sampaio, E. M. S. Castanheira, M. E. C. D. Real Oliveira and M. Lira, Comparison of IgA, TNF- α and surface tension of the tear film in two different times of the day, *Contact Lens Anterior Eye* **36** (2013) 140–145; <https://doi.org/10.1016/j.clae.2012.12.005>
30. M. Hotujac Grgurević, M. Juretić, A. Hafner, J. Lovrić and I. Pepić, Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **43** (2017) 275–282; <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1238924>

31. A. Ludwig and H. Reimann, Eye BT – Practical Pharmaceutics: An International Guideline for the Preparation, Care and Use of Medicinal Products, In Y. Bouwman-Boer, V. Fenton-May, & P. Le Brun (Eds.), (pp. 163–188). Cham: Springer International Publishing; https://doi.org/10.1007/978-3-319-15814-3_10
32. K. A. Fitzgerald, M. Malhotra, C. M. Curtin, F. J. O' Brien and C. M. O' Driscoll, Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery, *J. Control. Release* **215** (2015) 39–54; <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2015.07.020>
33. M. Ruponen and A. Urtti, Undefined role of mucus as a barrier in ocular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **96** (2015) 442–446; <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2015.02.032>
34. I. Pepić, J. Lovrić, B. Cetina-Čižmek, S. Reichl and J. Filipović-Grčić, Toward the practical implementation of eye-related bioavailability prediction models, *Drug Discov. Today* **19** (2014) 31–44; <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2013.08.002>
35. I. Krtalić, S. Radošević, A. Hafner, M. Grassi, M. Nenadić, B. Cetina-Čižmek, J. Filipović-Grčić, I. Pepić and J. Lovrić, D-Optimal Design in the Development of Rheologically Improved In Situ Forming Ophthalmic Gel, *J. Pharm. Sci.* **107** (2018) 1562–1571; <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2018.01.019>
36. J. Bassi da Silva, S. B. de S. Ferreira, O. de Freitas and M. L. Bruschi, A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **43** (2017) 1053–1070; <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1294600>
37. E. E. Hassan and J. M. Gallo, A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* (1990); <https://doi.org/10.1023/A:1015812615635>



Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment



Bisera Jurišić Dukovski^a, Marina Juretić^b, Danka Bračko^b, Danijela Randjelović^c, Snežana Savić^d, Mario Crespo Moral^e, Yolanda Diebold^{e,f}, Jelena Filipović-Grčić^a, Ivan Pepić^a, Jasmina Lovrić^{a,*}

^a University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Technology, Zagreb, Croatia

^b R&D, PLIVA Croatia Ltd, TEVA Group Member, Zagreb, Croatia

^c University of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Microelectronic Technologies, Belgrade, Serbia

^d University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Belgrade, Serbia

^e University of Valladolid, Institute of Applied Ophthalmology-Biology (IOBA), Valladolid, Spain

^f Biomedical Research Networking Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Dry eye disease
Nanoemulsion
NSAID
Chitosan
Lecithin

ABSTRACT

Inflammation plays a key role in dry eye disease (DED) affecting millions of people worldwide. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can be used topically to act on the inflammatory component of DED, but their limited aqueous solubility raises formulation issues. The aim of this study was development and optimization of functional cationic nanoemulsions (NEs) for DED treatment, as a formulation approach to circumvent solubility problems, prolong drug residence at the ocular surface and stabilize the tear film. Ibuprofen was employed as the model NSAID, chitosan as the cationic agent, and lecithin as the anionic surfactant enabling chitosan incorporation. Moreover, lecithin is a mixture of phospholipids including phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, two constituents of the natural tear film important for its stability. NEs were characterized in terms of droplet size, polydispersity index, zeta-potential, pH, viscosity, osmolarity, surface tension, entrapment efficiency, stability, sterilizability and *in vitro* release. NEs mucoadhesive properties were tested rheologically after mixing with mucin dispersion. Biocompatibility was assessed employing 3D HCE-T cell-based model and *ex vivo* model using porcine corneas. The results of our study pointed out the NE formulation with 0.05% (w/w) chitosan as the lead formulation with physicochemical properties adequate for ophthalmic application, mucoadhesive character and excellent biocompatibility.

1. Introduction

A stable precorneal tear film is a hallmark of ocular health, as it protects and moisturizes cornea and forms the primary refracting surface for light entering the visual system (Willcox et al., 2017). A two layered model of the tear film has been proposed, consisting of: (i) a mucoaqueous gel layer making up the bulk of the tear thickness and interacting directly with the epithelium, and (ii) an overlying very thin lipid layer, at least partly integrated with the mucoaqueous gel. Dry eye disease (DED), a multifactorial disease of the ocular surface, is characterized by a loss of homeostasis of the tear film (Craig et al., 2017).

The loss of homeostasis involves a quantitative or qualitative deficiency of tears that typically induces tear film instability, wetting defects and hyperosmolar stress, increased friction and chronic mechanical irritation at the ocular surface (Bron et al., 2017). This initiates a chain of inflammatory events and further ocular surface damage.

Currently, the main therapeutic options for DED are tear replacement and topical anti-inflammatory therapy (Jones et al., 2017). A topical ophthalmic formulation with or without an active pharmaceutical ingredient (API) is delivered directly on the ocular surface and excipients used in the formulation play an essential role in addressing quantitative or qualitative deficiency of tears. There are numerous over-

Abbreviations: DED, dry eye disease; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; NE, nanoemulsion; API, active pharmaceutical ingredient; CsA, cyclosporine A; O/W, oil-in-water; TFLL, tear film lipid layer; LMw and MMw, low and medium molecular weight; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; STF, simulated tear fluid; HBSS, Hank's balanced salt solution; KRB, Krebs-Ringer buffer; UPLC, Ultra-Performance Liquid Chromatography; RT, room temperature; PDI, polydispersity index; PCS, photon correlation spectroscopy; AFM, atomic force microscopy; ALI, air-liquid interface; PBS, phosphate buffered saline; BAK, benzalkonium chloride; TBUT, tear film breakup time

* Corresponding author.

E-mail address: jlovric@pharma.hr (J. Lovrić).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118979>

Received 24 October 2019; Received in revised form 16 December 2019; Accepted 17 December 2019

Available online 21 December 2019

0378-5173/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

the-counter products (artificial tears) aiming to replace and/or supplement the tear film. The most abundant component in these lubricant eye drops is the aqueous base with a variety of viscosity enhancing agents incorporated to improve lubrication and prolong the retention time on the ocular surface. More recently, a variety of lipids (e.g. mineral oils and phospholipids) have been incorporated in ocular lubricant formulations to help restoration of the tear film lipid layer (Benelli, 2011). APIs aiming at decreasing inflammation at the ocular surface include glucocorticoids, non-glucocorticoid immunomodulators (i.e. cyclosporine A (CsA) and tacrolimus), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and antibiotics (Jones et al., 2017).

Oil-in-water (O/W) nanoemulsions (NEs), ultrafine dispersions stabilized by an amphiphilic surfactant (Singh et al., 2017), hold great potential for effective treatment of DED (Jones et al., 2017; Lallemand et al., 2017). According to current understanding, mixing of a NE with the tear film compromises NE stability, the oil nanodroplets break down with time, the oil merges with the lipid layer of the tear film, and the surfactant components associate with the mucus layer (Gan et al., 2013; Walenga et al., 2019). Supplementation of a deficient tear film lipid layer (TFLL) with appropriate lipid components by merging with oil droplets possibly induces tear film stabilization. Furthermore, NEs effectively deliver APIs with limited aqueous solubility into the corneal segment giving delayed and sustained release (Lalu et al., 2017). This can be ascribed to oil nanodroplets that act as an API reservoir before and after merging with TFLL. As the majority of anti-inflammatory APIs have limited aqueous solubility, API-loaded NE can assure dry eye symptom relief due to tear film stabilization as well as anti-inflammation effects breaking the vicious circle of DED.

Over the past two decades NEs have been seriously investigated as a strategy to enhance the eye-related bioavailability of CsA following topical ocular instillation (Lallemand et al., 2017). These efforts led to the commercialization of three NE-based ophthalmic products for treatment of DED. Restasis® (Allergan) is a preservative-free anionic O/W NE of CsA-loaded castor oil, emulsified and stabilized by polysorbate 80 and carbomer copolymer, approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). Lacrinmune® (Bausch & Lomb, approved in Argentina) has a composition similar to that of Restasis®, except for the addition of sodium hyaluronate which increases formulation viscosity with the aim to prolong the residence time at the ocular surface. Ikervis® (Santen) is a cationic NE of medium-chain triglycerides emulsified and stabilized using tyloxapol, poloxamer 188 and cetylaluminum chloride, approved by the European Medicines Agency (EMA). In this formulation quaternary ammonium cetylaluminum chloride, an alkyl derivative of benzalkonium chloride, does not have a preservative role but it renders the oil nanodroplets positively charged. The presence of positive charge on the nanodroplet surface enables their electrostatic interaction with negatively charged ocular surface mucins, improving formulation precorneal residence (Daull et al., 2014). It is therefore assumed that the residence time of CsA in Ikervis® is longer than that in Restasis® (Lallemand et al., 2012), which, accompanied with higher dosage strength, could very likely explain the difference in dosing regimen between once-a-day Ikervis® versus twice-a-day Restasis® (Lallemand et al., 2017).

CsA is used in the treatment of more severe cases of DED; it has to be used for extended periods of time and its onset of action is postponed. Topical glucocorticoid or NSAID short-term pre-treatment could provide faster sign and symptom relief than topical CsA alone in severe DED (Jones et al., 2017). Moreover, topical glucocorticoids or NSAIDs have a potential for effective treatment of mild-to-moderate DED. Development of formulations with prolonged residence at the ocular surface would enable reduction of the required dose of glucocorticoids and NSAIDs providing better benefit-risk balance of future ophthalmic drug products (Subrizi et al., 2019). Therefore, further investigations are needed to explore the potential of glucocorticoids or NSAIDs in a pulse-dose form to break the vicious circle of DED, to develop effective formulations and to clarify the appropriate dosing schedules.

In this study, we propose the development of a functional cationic ophthalmic NE loaded with a NSAID aiming to relieve dryness, stabilize the tear film and act on the inflammatory component in mild-to-moderate DED patients. Special attention was paid to the selection of excipients in order to achieve optimal balance between formulation properties (droplet size and size distribution, zeta-potential, osmolarity, viscosity, surface tension and stability) and formulation effect on the ocular surface (mucoadhesion, tear film and corneal epithelium biocompatibility). The mucoadhesive biopolymer chitosan was chosen as a carrier of positive charge and was incorporated in NE using its interaction with the anionic surfactant lecithin. Lecithin is a natural lipid mixture of phospholipids including phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, two phospholipids that are commonly found in tears (Dean and Glasgow, 2012; Jones et al., 2017; Saville et al., 2011). Kolliphor® EL, a non-ionic surfactant commonly used in ophthalmic products, was used as the second (more hydrophilic) surfactant to optimize the NE droplet size and stability (Trotta et al., 2002). Ibuprofen was used as the model NSAID of highly lipophilic nature. The formulation biocompatibility assessment employing appropriate *in vitro* and *ex vivo* models has been included in this early phase of formulation development.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ibuprofen (Hubei Biocause Pharmaceutical Co., Ltd., Jingmen, China) was kindly donated by Pliva (Zagreb, Croatia). For NE preparation the following substances were used: Miglyol® 812 (Kemig, Zagreb, Croatia), lecithin (Lipoid S 45, Lipoid, Ludwigshafen, Germany), Kolliphor® EL (BASF, Ludwigshafen, Germany), glycerol (T.T.T., Sveta Nedjelja, Croatia), low molecular weight (M_w) chitosan (M_w range 50–190 kDa, degree of deacetylation range 75–85% and viscosity range of 1% (w/w) solution in 1% acetic acid 20–300 mPa s; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and medium M_w chitosan (M_w range 190–310 kDa, degree of deacetylation range 75–85% and viscosity range of 1% (w/w) solution in 1% acetic acid 200–800 mPa s; Sigma-Aldrich). Porcine gastric mucin type II was purchased from Sigma-Aldrich and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany). Fluorescein sodium salt was purchased from Sigma-Aldrich, HEPES from AppliChem, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). All other reagents were of analytical grade and purchased from Kemig or Sigma-Aldrich. Simulated tear fluid (STF) pH 7.4 was prepared by dissolving KCl (1.4 mg mL^{-1}), NaCl (6.8 mg mL^{-1}), NaHCO_3 (2.2 mg mL^{-1}) and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.08 mg mL^{-1}) in double-distilled water. Hank's balanced salt solution (HBSS) pH 6.0 was prepared by dissolving KCl (0.4 mg mL^{-1}), NaHCO_3 (0.35 mg mL^{-1}), NaCl (8.0 mg mL^{-1}), D-glucose monohydrate (1.1 mg mL^{-1}), KH_2PO_4 (0.06 mg mL^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.06 mg mL^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.185 mg mL^{-1}), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg mL^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg mL^{-1}) and HEPES (7.15 mg mL^{-1}) in double-distilled water. Krebs-Ringer buffer (KRB) pH 7.4 was prepared by dissolving KCl (0.4 mg mL^{-1}), NaCl (6.8 mg mL^{-1}), NaHCO_3 (2.1 mg mL^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mg mL^{-1}), D-glucose monohydrate (1.1 mg mL^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.52 mg mL^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.158 mg mL^{-1}) and HEPES (3.575 mg mL^{-1}) in double-distilled water.

2.2. Solubility study

The solubility of ibuprofen in Miglyol® 812 and lecithin/Miglyol® 812 (1:50, w/w) solution was determined by adding an excess amount of drug to 5 g of oil or lecithin solution in oil and subsequent magnetic stirring at 25 °C during 48 h to reach equilibrium. Afterwards, the samples were centrifuged for 30 min at 1520g and the supernatants

filtered through 0.2 µm Spartan™ regenerated cellulose filters (Whatman, United Kingdom). The samples were further diluted with methanol and ibuprofen concentration was analyzed using Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC), as described in Section 2.13.

2.3. Nanoemulsion preparation

2.3.1. Nanoemulsions with lecithin and Kolliphor® EL

NEs with 5% (w/w) Miglyol® 812 and increasing amounts of lecithin (0.1–1.0%, w/w) were prepared using microfluidizer (Model M-110EH-30, Microfluidics®, Westwood, MA, USA). Before homogenization lecithin was dissolved in Miglyol® 812 at room temperature (RT) under magnetic stirring. Lecithin solution in Miglyol® 812 (oil phase) was added to water phase under magnetic stirring, and the mixture was further pre-homogenized with Ultra-Turrax® (IKA-Werke GmbH & Company, Staufen, Germany) during 5 min at 6000 rpm. The obtained coarse emulsion was then processed with microfluidizer under the pressure of 1000 bar and 10 cycles.

NEs with 5% (w/w) Miglyol® 812, 0.1% (w/w) lecithin and increasing amounts of Kolliphor® EL (0.25–2.5%, w/w) were prepared as described above using the water phase containing Kolliphor® EL.

Process parameters (pressure and number of cycles) were optimized on a coarse O/W emulsion containing 5% (w/w) Miglyol® 812, 0.1% (w/w) lecithin and 0.5% (w/w) Kolliphor® EL. The pressure and the number of cycles were varied in the range 400–1300 bar and 1–15, respectively. NE with the same composition was also prepared using high-pressure homogenizer (Panda Plus 2000®, GEA Niro Soavi, Parma, Italy) under the pressure of 1000 bar and 5 cycles.

2.3.2. Chitosan-coated nanoemulsions

Chitosan-coated NEs were prepared with two different methods using increasing amounts of low (LM_w) or medium (MM_w) M_w chitosan. In the first method, optimized uncoated NE prepared using microfluidizer (1000 bar, 5 cycles) was magnetically stirred with different amounts of 1% (w/w) chitosan (LM_w or MM_w) solution (filtered, prepared in 0.5%, w/w acetic acid). The final chitosan concentration ranged from 0.05 to 0.5% (w/w) while the concentration of Miglyol® 812 was fixed at 2.5% (w/w). In the second method, different amounts of 1% (w/w) chitosan (LM_w) solution were added to the aqueous Kolliphor® EL solution (water phase) prior phase mixing and processing on microfluidizer (1000 bar, 5 cycles). The final chitosan concentration in NEs was 0.05 and 0.3% (w/w) and the concentration of Miglyol® 812 was again fixed at 2.5% (w/w).

2.3.3. Ibuprofen-loaded nanoemulsions

Ibuprofen-loaded chitosan-coated and uncoated NEs were prepared by dissolving ibuprofen (0.2%, w/w) in the oil phase (lecithin solution in Miglyol® 812) at RT under magnetic stirring. Glycerol (2.5%, w/w) was added to the water phase to adjust NE tonicity. Uncoated ibuprofen-loaded NE was prepared as described above, using microfluidizer (1000 bar, 5 cycles). Chitosan-coated ibuprofen-loaded NEs were prepared using the second method described in Section 2.3.2.

2.4. Droplet size, size distribution and zeta-potential analysis

Droplet size, polydispersity index (PDI) and zeta-potential of NEs were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) using Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) at 25 °C. For that purpose NE samples were diluted 500 (droplet size and PDI) and 100 (zeta-potential) times (V/V) with 0.45 µm filtered double-distilled water and 10 mM NaCl solution, respectively. The detection angle used for droplet size and PDI measurement was 90°. A disposable folded capillary cell (DTS1070) was used for zeta-potential measurement.

2.5. Morphological analysis

Atomic force microscopy (AFM) was employed to determine the morphological properties and to confirm data obtained on droplet size and PDI by PCS. AFM was performed using AutoProbe CP-Research SPM (TM Microscopes-Bruker) with 90 µm large area scanner. Formulations were diluted with ultra-pure water 500 times (V/V), 10 µL of diluted sample was placed on circular mica substrate (Highest Grade V1 AFM Mica Discs, Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) and dried in vacuum. Due to the nature of the samples, noncontact mode was applied. AFM measurements were performed in air, using noncontact probes Bruker Phosphorous doped silicon Tap300, model MPP-11123-10 with Al reflective coating and symmetric tip. Driving frequency of the cantilever was about 300 kHz. Both topography and “error signal” AFM images were taken and later analyzed using the software Image Analysis 2.2.0 (NT-MDT, Moscow, Russia).

2.6. pH, osmolarity and surface tension

The pH of NEs was determined using a Seven Multi pH/conductometer (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) at 25 °C. Osmolarity was determined by freezing point depression method (Advanced® 3D3 Single-Sample Osmometer, Advanced Instruments, Norwood, MA, USA). The surface tension measurements were performed with Krüss K-100C tensiometer (Hamburg, Germany). Surface tension values were determined employing Du Noüy ring method. All the measurements were made in triplicate at 25 °C using water circulating bath with temperature stability within 0.02 °C.

2.7. Ibuprofen entrapment efficiency

The amount of ibuprofen entrapped in the oil droplets was determined by ultrafiltration. A 2 mL aliquot of ibuprofen-loaded NE was transferred to the upper chamber of a centrifuge tube fitted with ultrafilter (Centricon®, NMWL 10 kDa, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA), which was then centrifuged at 5000-g for 1 h. The entrapment efficiency (EE %) was calculated from the following equation:

$$EE\% = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100 \quad (1)$$

where W_t is the total amount of ibuprofen in the NE and W_f is the amount of ibuprofen in the filtrate, which was determined by UPLC, as described in Section 2.13.

2.8. Stability studies

NEs were stored for 30 days at 4 and 25 °C, after which droplet size, PDI, zeta-potential and pH were measured to evaluate stability. Stress tests (heating–cooling cycles, centrifugation and freeze-thaw cycles) were performed as previously described (Shafiq et al., 2007). Six cycles between 4 and 45 °C were done with storage at each temperature not less than 48 h. Centrifugation was performed at 9000-g during 30 min. In the end, NEs were subjected to three freeze-thaw cycles between –20 and 25 °C with storage at each temperature not less than 48 h. After each cycle or centrifugation NEs were examined visually for phase separation and characterized in terms of droplet size, PDI and zeta-potential to evaluate stability. For each of the stress tests freshly prepared NE formulations were used.

2.9. Nanoemulsion sterilization

NEs were aseptically filtered through 0.2 µm polyethersulfone (PES) filter or autoclaved at 121 °C for 20 min. After each sterilization process NEs were examined visually for phase separation and characterized in terms of droplet size, PDI and zeta-potential.

2.10. *In vitro* ibuprofen release

In vitro ibuprofen release was determined using US Pharmacopeia apparatus type II (708-DS Dissolution Apparatus, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) modified by the addition of a cellulose acetate dialysis bag (Spectra/Por1 4 Dialysis Tubing, MWCO 12–14 kDa, Medicell International Ltd, London, UK). NE sample (1 mL) was placed in the dialysis bag, the bag was sealed and tied to the apparatus paddle and immersed in 900 mL of phosphate buffer pH 7.4 (34 °C, 50 rpm). At scheduled time intervals, 2 mL aliquots were withdrawn and replaced with fresh dissolution medium. The samples (including donor compartments at the end of the experiment) were analyzed for ibuprofen content by UPLC method, as described in Section 2.13. All experiments were performed at least in triplicate.

2.11. Mucoadhesive properties

NE mucoadhesive properties were determined by a slightly modified simple rheological method (Hassan and Gallo, 1990) using MCR 102 rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) equipped with a cone-plate measuring device (CP 50-1, trim position 102 μm). For this purpose a 20% (w/w) mucin dispersion in STF was prepared by overnight magnetic stirring at RT. Mucin dispersion (10%, w/w) with or without NE was prepared by the addition of NE or water in 1:1 (w/w) ratio in the 20% (w/w) mucin dispersion in STF. The resulting mixtures were magnetically stirred at 750 rpm during 15 min, and subsequently left without stirring for 1 h at RT before measurement. NEs mixed with STF in 1:1 (w/w) ratio were prepared in the same way. Flow curves of all samples were measured at the shear rate range 0.1–100 s^{-1} and 34 °C. To calculate the viscosity component due to bioadhesion (η_b) viscosity values at the shear rate of 100 s^{-1} were used and η_b was calculated from the equation:

$$\eta_b = \eta_t - \eta_m - \eta_n \quad (2)$$

where η_t is viscosity of the measured sample, η_m viscosity of 10% (w/w) mucin dispersion and η_n viscosity of NE mixed with STF in 1:1 (w/w) ratio. All measurements were performed in triplicate.

2.12. Biocompatibility studies

2.12.1. *In vitro* corneal biocompatibility

Human corneal epithelial cells (HCE-T, RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) were used for cultivation of 3D HCE-T cell-based model as previously described (Juretic et al., 2017). Briefly, Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts (0.4 μm pore size, 12 mm diameter, surface area 1.12 cm^2 , Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands) were coated with rat tail type I collagen (225 μg per well; Sigma-Aldrich) and human fibronectin (4 μg per well; Sigma-Aldrich). HCE-T cells suspended in supplemented DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) medium (Juretic et al., 2017) (10^5 cells in 0.5 mL) were seeded onto the coated polycarbonate filter, and 1.5 mL of the culture medium was added to the basolateral side. The cells were cultivated submerged in the medium until a sharp increase in transepithelial electrical resistance (TEER) was observed (from 4 to 7 days), after which they were exposed to the air-liquid interface (ALI) for the following 3 days. The culture medium was changed every 2 days during the submerged conditions and every day during the exposure to the ALI. During the ALI exposure, the inserts were lifted on a metal plate to increase the basolateral volume to 2 mL.

Before treatment with the NE samples, the medium was aspirated from the basolateral side, the metal plate was removed and the inserts were washed with HBSS. The inserts were then transferred to a new 12-well cell culture plate (Corning B.V. Life Sciences) and incubated for 30 min in HBSS (0.5 mL apical side/1.5 mL basolateral side) at 37 °C. After incubation, HBSS from the apical side was removed and 0.5 mL of NE sample diluted 10 times (V/V) in HBSS pH 6.0, as previously

described (Kinnunen et al., 2014), was added and the model was incubated for 30 min at 37 °C. HBSS only and ibuprofen suspension (0.2 mg mL^{-1}) in HBSS were used as controls. All the samples were tested in triplicate. The pH of HBSS was set to 6.0 in order to ensure protonated form of chitosan on the NE droplet surface (Rinaudo, 2016). After incubation the test samples were removed from the apical side, the inserts were washed with HBSS and displaced to a new 12-well plate with the metal plate and 2 mL of medium at the basolateral side. MTT assay was performed after 24 h according to the protocol by Pauly and coworkers (Pauly et al., 2009). The medium was removed and 0.7 mL of MTT solution in the medium (0.5 mg mL^{-1}) was added to both apical and basolateral side and the cell model was incubated for 3 h at 37 °C. Subsequently, the MTT solution was removed and formazan crystals were dissolved by the addition of 0.7 mL of isopropanol (Kemig) to both sides. The absorbance was measured at 570 nm with a microplate reader (1420 Multilabel counter VICTOR³, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

2.12.2. *Ex vivo* corneal biocompatibility

Corneal biocompatibility was assessed on freshly excised porcine corneas. Briefly, fresh porcine eyeballs were obtained from Large White pigs (age 6–7 months, weight 90–115 kg, both female and male animals) from a local slaughterhouse. Porcine eyeballs were enucleated, rinsed with an isotonic saline solution (NaCl 0.9%; B. Braun, Melsungen, Germany) and transported in cold KRB buffer in a container held on ice. After transport, the eyeballs were submerged in 1% Betadine® solution (Alkaloid, Skopje, North Macedonia) for 3–5 min for microbial decontamination and subsequently washed with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS; Sigma-Aldrich) containing 1% (V/V) penicillin/streptomycin/amphotericin B mixture (Cat. No. 17-745E; Lonza, Basel, Switzerland). The transport of porcine eyeballs and the excision of corneo-scleral buttons were performed within 2 h of animal death. The corneas were excised as corneo-scleral buttons in a laminar-flow hood (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and placed with the epithelial side down on 15 mL conical centrifuge tube caps. 1 mL of 4% (w/V) agar (Muller Hinton II Agar, BBL™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) in DMEM/F-12 (Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) cell culture medium without supplements, previously autoclaved (121 °C, 20 min) and if necessary reheated in a microwave to a liquid state was pipetted on endothelial side of each corneo-scleral button, in order to enable the formation of a naturally curved shape of the corneas. After cooling and subsequent gelling of the agar solution the corneo-scleral buttons were placed on a 6-well plate (endothelial side down) and 3.5 mL of DMEM/F-12 (Gibco®, Life Technologies™), supplemented with 10% (V/V) FBS (Biosera, Bousens, France) and 10% (V/V) penicillin/streptomycin/amphotericin B mixture was added to each well, so that the corneas were exposed to the air. The corneo-scleral buttons were left overnight in the incubator (humidified atmosphere, 5% CO_2 , 37 °C) and treatment with the NE samples was done the following day. The medium was aspirated and custom-made silicone rings were placed onto the corneas. 200 μL of a test sample was added inside each ring and the corneas were incubated at 37 °C for 5 and 15 min. After each time-point the samples were removed, the corneas were washed with PBS and the extent of any corneal damage was evaluated visually with the aid of fluorescein solution (2 mg mL^{-1}) in PBS and a cobalt-blue lamp (Conóptica, Barcelona, Spain). Briefly, the silicone rings were placed on the corneas again and 200 μL of the fluorescein solution was put inside and left for 20 s. The fluorescein solution was removed, the corneas were washed with PBS and photographs were taken through a yellow filter of the cobalt-blue lamp. PBS was used as negative control, while acetone (Sigma-Aldrich), 0.1 M NaOH solution and 0.025% (w/V) benzalkonium chloride (BAK; Sigma-Aldrich) solution in PBS were used as positive controls. All the samples were tested in triplicate.

2.13. Quantification

The quantitative determination of ibuprofen was performed by UPLC using an Agilent Infinity 1290 (Agilent) with the Acquity UPLC BEH Shield RP18 Column (1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm) (Waters, Milford, MA, USA) and isocratic elution. For ibuprofen solubility study ibuprofen solutions in oil were diluted with methanol. The mobile phase was composed of NaH_2PO_4 buffer (prepared in Milli-Q™ water (Merck-Millipore), 1.2 mg mL⁻¹, pH 2.5) and acetonitrile (ACN; Merck-Millipore) in 60:40 (V/V) ratio. The following UPLC conditions were applied: column temperature 50 °C, flow rate 0.4 mL min⁻¹, injection volume 4 μL , detection wavelength 225 nm. For ibuprofen entrapment efficiency the filtrates were analyzed without dilution. The following UPLC conditions were applied: mobile phase buffer:ACN in 65:35 (V/V) ratio, column temperature 50 °C, flow rate 0.8 mL min⁻¹, injection volume 4 μL , detection wavelength 225 nm. For ibuprofen quantification in *in vitro* release samples, different methods were used for receptor and donor compartment sample analysis. The receptor compartment samples were analyzed using the same method as for ibuprofen entrapment efficiency analysis, with the only difference in the injection volume which was 20 μL . The donor compartment samples were diluted with methanol prior analysis and then analyzed with the method used for ibuprofen solubility study. All samples and standard solutions were filtrated through 0.2 μm Spartan™ regenerated cellulose filters prior analysis. For each sequence standard solutions were prepared in duplicate and injected alternately. At least five standard solution injections were done in each injection sequence. System suitability was evaluated according to the following criteria: relative standard deviation (RSD) of the detector response factor for all standard solution injections in the sequence is not more than 2.0% and tailing factor of ibuprofen peak is not more than 1.5. The UPLC methods were validated in terms of linearity, accuracy and repeatability. The methods were found to be linear ($R^2 \geq 0.99$), accurate (recovery values 98–102%) and repeatable (relative standard deviation of peak area (RSD) $\leq 2.0\%$).

2.14. Statistical analysis

Statistical analyses were performed on the data obtained from the study on mucoadhesion and *in vitro* biocompatibility using One-way ANOVA followed by a multiple comparisons Tukey's and Dunnett's post hoc test, respectively with $P < 0.05$ set as the minimal level of significance. Calculations were performed with the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA; www.graphpad.com).

Ibuprofen *in vitro* release profiles from the tested NEs and controls were compared by the similarity factor (f_2) calculation, as previously described (Diaz et al., 2016). The mean cumulative amounts of the released drug from the two formulations were compared at each time point. The release profiles were considered similar when $f_2 > 50$.

3. Results and discussion

Ophthalmic NEs are complex dosage forms with several physicochemical parameters, such as nanodroplet size, size distribution and zeta-potential, formulation viscosity profile as a function of applied shear, pH, osmolarity, and surface tension, affecting their *in vivo* performance (Qu et al., 2018; Walenga et al., 2019). Although NEs are complex, they can be easily manufactured on a large scale using specific equipment, such as microfluidizers and high-pressure homogenizers, and sterilized by filtration or autoclavation. Formulation parameters (type and concentration of excipients) as well as process parameters (homogenization pressure and number of homogenization cycles) are the determinants of formulation physicochemical parameters, but specifically for the treatment of DED, formulation parameters are possibly the key determinants of formulation effect on the tear film stability. In clinical studies of CsA NE, a significant improvement over the baseline

for several *in vivo* outcome measures was indicated for formulation without API (Simmons and Vehige, 2007; Stevenson et al., 2000; Walenga et al., 2019). Moreover, studies that measured tear film breakup time (TBUT), a metric of tear film stability defined as the time from the opening of the eyelids to the initial dry spot formation, showed an increase in TBUT 1 h after instillation of an artificial tear product with composition similar to Restasis® (Simmons and Vehige, 2007). The long residence time of the lipid components, detected 3 to 4 h after instillation, may be the cause of TBUT enhancement (Stevenson et al., 2000; Walenga et al., 2019). Therefore, special emphasis should be placed on the selection of excipients in order to obtain a functional NE for DED treatment.

3.1. Excipient and formulation considerations

While in primary NEs oil phase is emulsified with water phase using a surfactant, in secondary NEs an oppositely charged polyelectrolyte is deposited over a primary NE droplet surface (Rai et al., 2018). To obtain positively charged secondary NEs, we selected chitosan as the positively charged polyelectrolyte and Lipoid S 45 lecithin as the anionic surfactant enabling interaction with chitosan (Hafner et al., 2009). Moreover, Lipoid S 45 lecithin is a fat-free soybean lecithin with 45% (w/w) phosphatidylcholine and 10–18% (w/w) phosphatidylethanolamine, two constituents of the natural tear film important for its stability. Moreover, studies suggest that lower levels of the two polar phospholipids are present in individuals with tear film deficiencies (Jones et al., 2017; McCulley and Shine, 1997; Shine and McCulley, 1998).

The selection of the internal oil phase depends on the compatibility of the oil with lecithin and on the solubility of the drug in the oil, especially because the oil phase concentration in the eye drops should not exceed 5% (Tamilvanan and Benita, 2004). In this study, among ophthalmically acceptable oils tested (castor oil, soybean oil, sesame oil), lecithin was easily soluble without heating only in Miglyol® 812, a medium-chain-triglyceride (MCT) oil consisting of a mixture of triglycerides of saturated fatty acids. Furthermore, ibuprofen was also shown to have high solubility in Miglyol® 812 ($92.7 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$) and Miglyol® 812/lecithin (50:1, w/w) solution ($101.3 \pm 3.3 \text{ mg g}^{-1}$).

A total of 5 NE formulations of Miglyol® 812 (5%, w/w) and lecithin (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1%, w/w) were prepared by microfluidization under the pressure of 1000 bar and 10 cycles (Table 1). The resulting NEs were highly fluid and homogenous with milky-white appearance, characterized with droplet size from 251.6 to 140.1 nm, PDI from 0.100 to 0.174 and zeta-potential from -40.1 to -48.8 mV with increasing the amount of lecithin in the formulation. At this point, the concentration of lecithin adequate to render the droplets negatively charged was to be determined and, as it can be seen from Table 1, all the NEs prepared had highly negative zeta-potential. The most important criterion in manufacturing NEs is to obtain a desired droplet size with monomodal distribution. The mean droplet size expectedly decreased with the increase in the amount of lecithin, but with lecithin concentrations higher than 0.75% (w/w) PDI started to increase. Even though the NE produced with the lowest concentration of lecithin (0.1%, w/w) had the largest mean droplet size, it was chosen for further

Table 1

Droplet size, PDI and zeta-potential of NEs with 5% (w/w) Miglyol® 812 and increasing amounts of lecithin.

Lecithin (% w/w)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)
0.1	251.6 \pm 1.6	0.100 \pm 0.016	-40.1 ± 1.5
0.25	220.1 \pm 2.4	0.089 \pm 0.018	-44.9 ± 1.3
0.5	184.8 \pm 1.2	0.116 \pm 0.008	-46.9 ± 1.0
0.75	160.1 \pm 1.9	0.112 \pm 0.010	-48.9 ± 1.2
1.0	140.1 \pm 2.5	0.174 \pm 0.048	-48.8 ± 1.2

Values are mean \pm SD ($n = 2$).

Table 2

Droplet size, PDI and zeta-potential of NEs with 5% (w/w) Miglyol® 812, 0.1% (w/w) lecithin and increasing amounts of Kolliphor® EL.

Kolliphor® EL (% w/w)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)
0.25	212.3 ± 3.8	0.112 ± 0.017	-20.7 ± 0.7
0.5	181.1 ± 2.9	0.092 ± 0.026	-15.9 ± 0.4
1.0	138.6 ± 1.8	0.108 ± 0.017	-13.0 ± 0.4
2.0	99.1 ± 1.9	0.176 ± 0.019	-6.2 ± 0.6
2.5	83.6 ± 1.2	0.201 ± 0.018	-3.6 ± 0.3

Values are mean ± SD (n = 2).

formulation development studies because its zeta-potential was already highly negative, and another non-ionic surfactant was to be introduced for further droplet size reduction and stabilization.

It has already been demonstrated that a combination of lecithin with a second more hydrophilic surfactant can lead to formation of NEs with decreased droplet size and increased stability, even in the presence of an API (Trotta et al., 2002). Therefore, Kolliphor® EL was included as the second, more hydrophilic surfactant, as it is approved in ophthalmic formulations by the FDA in concentrations up to 5% (FDA Database: Inactive ingredients). A total of 5 NE formulations of Miglyol® 812 (5%, w/w), lecithin (0.1%, w/w) and Kolliphor® EL (0.25, 0.5, 1, 2 and 2.5%, w/w) were prepared by microfluidization (Table 2). The addition of Kolliphor® EL in NE with lecithin caused an expected droplet size reduction. Even though a slight increase in PDI was noticed with Kolliphor® EL concentrations higher than 1% (w/w), all NEs had PDI ≤ 0.200 and were therefore considered to be monodisperse (Klang and Valenta, 2011). Most importantly, the addition of Kolliphor® EL had a major influence on NE zeta-potential; the zeta-potential values were approaching zero with the increase in Kolliphor® EL concentration. The presence of the non-ionic surfactant, Kolliphor® EL on the droplet surface probably reduced the density of negatively charged molecules from lecithin packed on the droplet surface. Thus, to decide which formulation should be selected for further studies, a compromise was made between the lowest droplet size and PDI and a zeta-potential negative enough to enable electrostatic interaction with positively charged chitosan molecules. NE with 0.5% (w/w) Kolliphor® EL with droplet size 181.1 ± 2.9 nm, PDI of 0.092 ± 0.026 and zeta-potential of -15.9 ± 0.4 mV was chosen for further studies.

After optimizing the formulation parameters (i.e. the concentration of lecithin and Kolliphor® EL), optimization of process parameters was performed. The homogenization pressure and the number of cycles (passes of the formulation through microfluidizer) were gradually increased and the results are graphically shown in Fig. S1. In accordance with previously reported data (Meleson et al., 2004; Uluata et al., 2016), the formulation droplet size and PDI decreased with increasing homogenization pressure and number of cycles, while the zeta-potential remained practically unchanged through all the conditions applied. However, no further droplet size (and PDI) reduction was achieved

when the homogenization pressure was increased to 1300 bar. Therefore, the homogenization pressure of 1000 bar was chosen for further studies. Even though only a minor droplet size reduction (3.6 nm) was achieved when the number of cycles under this pressure was increased from 3 to 5, we decided to use 5 cycles for further NE preparation to assure sufficient homogenization of the formulations. The same optimized formulation was prepared under the selected process parameters (1000 bar, 5 cycles) using a high-pressure homogenizing device and similar results (droplet size, PDI, zeta-potential) were obtained (Fig. S2), which indicates that preparation of the formulation could be transferable to high-energy methods other than microfluidization.

The cationic polysaccharide chitosan was chosen to form a coating around the oil droplets making them positively charged and therefore mucoadhesive. The selection of chitosan was also based on its biocompatibility and biodegradability since it can be degraded by lysozyme which is highly concentrated in tears (de la Fuente et al., 2010). Additionally, the antimicrobial properties of chitosan could be very advantageous for patients with DED who often suffer secondary infections (de la Fuente et al., 2010). To obtain chitosan-coated secondary NEs, we screened the effect of addition of LM_w and MM_w chitosan solution to the prepared NE under magnetic stirring. The final chitosan concentration ranged from 0.05 to 0.5% (w/w). Since chitosan was added as 1% (w/w) solution, the concentration of other NE components (oil and surfactants) decreased. To assure the same nanodroplet surface area available for coating with chitosan molecules, the concentration of Miglyol® 812 was set to 2.5% (w/w) in all the formulations by the addition of double-distilled water where necessary. Chitosan-coated NEs prepared with LM_w chitosan had lower droplet size and PDI values than those prepared with MM_w chitosan (Table 3), which can be explained by a thinner coating layer formed by chitosan with lower M_w (Li et al., 2016). Chitosan M_w did not seem to have a strong influence on the final NE zeta-potential, as already reported (Mun et al., 2006). Therefore, LM_w chitosan was chosen for further formulation optimization in low and high concentration (0.05 and 0.3%, w/w) resulting with zeta-potential of 29.2 ± 0.2 and 40.3 ± 0.9 mV, respectively. Further step was the addition of chitosan in the aqueous phase prior phase mixing and processing on microfluidizer. The comparison between chitosan-coated NEs obtained with the two different methods is shown in Table 4. A decrease in NE mean droplet size, zeta-potential and PDI is evident when chitosan is added prior processing on microfluidizer. The moment of chitosan addition to the formulation seemed to have a major impact on the final NE characteristics. The observed decrease in droplet size, PDI and zeta-potential could be a consequence of intercalation of chitosan molecules between surfactant molecules at the droplet surface and a mixed interfacial film formation with overall positive surface charge (Jumaa and Muller, 1999). The NE formulation with higher chitosan concentration had higher PDI, which was expected because chitosan products show a broad range of molecular weights (Nguyen et al., 2009). The morphological AFM analysis was performed as a complementary method to confirm the results obtained by PCS. The

Table 3

Droplet size, PDI and zeta-potential of NEs with 2.5% (w/w) Miglyol® 812, 0.05% lecithin, 0.25% (w/w) Kolliphor® EL and different chitosan (low (LM_w) and medium molecular weight (MM_w)) concentrations.

Chitosan (% w/w)	LM _w			MM _w		
	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)
0.05	199.6 ± 1.6	0.072 ± 0.002	29.2 ± 0.2	255.9 ± 44.7	0.240 ± 0.066	31.8 ± 1.3
0.1	199.3 ± 4.5	0.138 ± 0.052	32.7 ± 0.1	282.6 ± 9.6	0.305 ± 0.003	35.3 ± 1.0
0.2	279.0 ± 28.4	0.288 ± 0.001	37.4 ± 0.0	418.7 ± 139.3	0.652 ± 0.039	38.9 ± 1.6
0.3	360.9 ± 14.7	0.489 ± 0.013	40.3 ± 0.9	583.7 ± 36.1*	0.841 ± 0.023	41.4 ± 2.4
0.4	390.1 ± 27.4	0.504 ± 0.014	39.0 ± 0.5	626.8 ± 74.3*	0.853 ± 0.065	42.2 ± 2.2
0.5	325.7 ± 15.0	0.535 ± 0.070	42.7 ± 1.6	749.4 ± 27.7*	0.791 ± 0.175	44.0 ± 2.0

Values are mean ± SD (n = 2).

* The result may not represent the real mean value due to very high PDI (> 0.7).

Table 4
Comparison of LM_w chitosan coated NEs prepared with two different methods described in Section 2.3.2.

Chitosan (% w/w)	Chitosan added after microfluidization			Chitosan added before phase mixing		
	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)
0.05	199.6 ± 1.6	0.072 ± 0.002	29.2 ± 0.2	179.3 ± 2.3	0.061 ± 0.015	18.7 ± 1.9
0.3	360.9 ± 14.7	0.489 ± 0.013	40.3 ± 0.9	179.3 ± 7.6	0.169 ± 0.011	30.0 ± 1.5

Values are mean ± SD (n = 2).

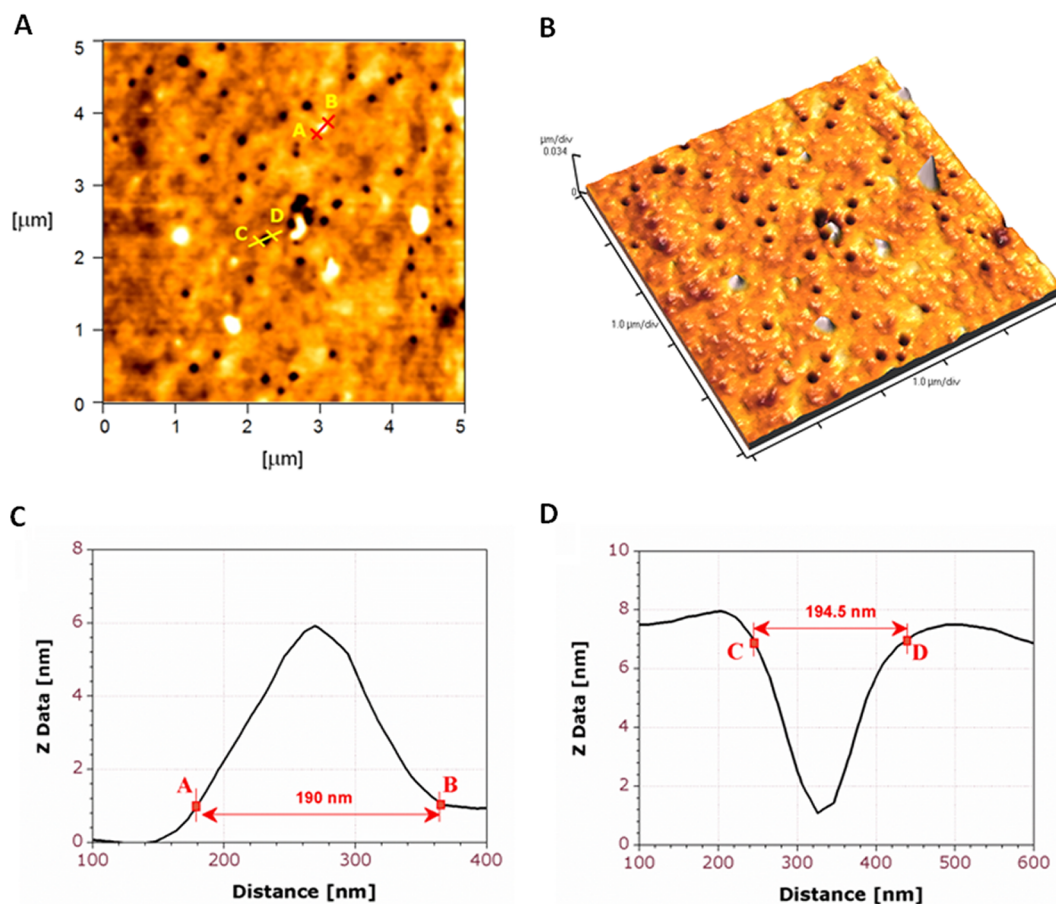


Fig. 1. AFM images of NC2 formulation (0.3%, w/w LM_w chitosan, 2.5%, w/w Miglyol® 812, 0.05%, w/w lecithin and 0.25%, w/w Kolliphor® EL): (a) 2D topography (5 × 5 μm scan area); (b) 3D topography (5 × 5 μm scan area); (c) and (d) profiles of two representative NE droplets marked on the 2D topography (a).

analysis pointed out spherical droplets with dimensions similar to those obtained with PCS measurements (Fig. 1). Thus, the second preparation method where the addition of chitosan to the formulation is done before processing on microfluidizer was used in further studies, leading to the lowest droplet size and PDI of chitosan-coated NEs.

Optimized chitosan-coated NEs with 0.05 (NC1) and 0.3 (NC2) % (w/w) chitosan, and the uncoated control formulation (N) stored in ambient or refrigerated conditions over 30 days did not show any significant differences in their appearance. However, in comparison to freshly obtained formulations a certain decrease in PDI was observed, especially after 30-day storage at 25 °C (Fig. 2). NC1 did not show major changes in droplet size, but the droplet size of NC2 notably increased after 30-day storage at 25 °C. A small increase in zeta-potential was also observed for NC2 formulation stored at 25 °C. Acceptable stability was further studied with special thermodynamic stability tests, which predict droplet integrity in case of temperature fluctuations (6 cycles of refrigeration and heat, 3 freeze-thaw cycles) (Fig. 3). NC1 and NC2 remained visually unchanged showing no phase separation. Heating-cooling cycles caused certain droplet size increase in NC2 (approximately 1.6 times), with noticeable PDI fluctuations, but

without significant changes in zeta-potential. On the other hand, heating-cooling cycles did not cause notable changes in the formulations N and NC1. Three freeze-thaw cycles showed negligible effect on droplet size and zeta-potential of all NEs tested, with certain PDI increase in NC2. Kinetic instability such as creaming, settling or any other form of phase separation was ruled out by centrifugation of the formulations at 9000g. After centrifugation an apparent phase separation was observed in all the formulations, but after only a mild agitation the formulations turned uniform again, which was also confirmed by droplet size, PDI and zeta-potential measurements (Fig. 3). Although these stability studies demonstrated superior stability of NC1 over the NC2 formulation, none of the formulations showed creaming or phase separation after 30-day storage or stress tests, which was the prerequisite for ibuprofen introduction.

3.2. Loading of chitosan-coated NEs with ibuprofen and their optimization for topical ophthalmic administration

In ophthalmic formulations, ibuprofen is used at low concentrations (between 0.1 and 0.2%, w/w). Ibuprofen-loaded NEs were prepared by

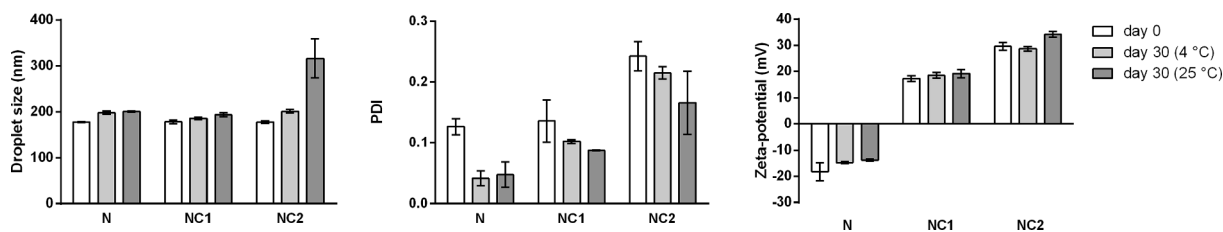


Fig. 2. Droplet size, PDI and zeta-potential of chitosan-coated NEs with 0.05 (NC1) and 0.3 (NC2) % (w/w) chitosan, and the uncoated control formulation (N) measured after preparation and 30-day storage at 4 or 25 °C. NEs were prepared by adding chitosan to water phase before phase mixing and microfluidization. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 2-3$).

ibuprofen dissolution in the oil phase prior phase mixing and the final NE composition is shown in Table 5. In addition to ibuprofen incorporation in the oil phase, in this step of chitosan-coated NE optimization, formulation tonicity was adjusted by the addition of glycerol in the aqueous phase. Glycerol was chosen as the tonicity agent not to induce significant alterations in the physicochemical properties of the chitosan-coated NEs (Teixeira et al., 2017) and also due to its short-lasting osmoprotective effect (Baudouin et al., 2013).

Ibuprofen is a weak acid, BCS class II compound, and its molecules are well encapsulated into the oil droplets due to the hydrophobic character of the drug (Gue et al., 2016). Ibuprofen entrapment efficiency was higher than 98% in all the NEs (Table 6). Droplet size and PDI remained similar after ibuprofen incorporation, but the zeta-potential of chitosan-coated INC1 and INC2 formulations was slightly higher than for unloaded NC1 and NC2 formulations (Table 6). *In vivo* performance of ophthalmic NEs is further affected by the formulation pH, surface tension and viscosity profile as the function of the applied shear. The pH of all the chitosan-coated NE formulations was around 4.5 regardless of ibuprofen incorporation (Table 6), due to the acetic acid addition necessary to dissolve chitosan. Wide pH range can be

tolerated by the ocular surface, especially when the ophthalmic product is not buffered (Lang et al., 2005; Fialho and da Silva-Cunha, 2004). A study performed on 6 healthy volunteers showed that immediately after the instillation of 20 μ L of 0.067 M phosphate-buffered saline, pH 5.5, the pH value of the tear film was found to be about 6.0–6.5 and that the tear film rapidly became more alkaline, reaching pH 7 in about 1 min, and approximately its normal value in an additional 1–1.5 min (Yamada et al., 1998). It is generally accepted that low pH of an ophthalmic product will not necessarily cause stinging or discomfort upon instillation if the pH of the tears can be rapidly brought back to normal values (Lang et al., 2005), but data about the buffering capacity of tears in DED are lacking. However, there are studies that indicate slightly higher pH of tears of participants with DED (Khurana et al., 1991; Norn, 1988). Even though DED patients often have lower tear volume, this alkaline shift might be a compensatory mechanism to return the pH of tears to more neutral values after instillation of an acidic ophthalmic product, as it is the case with chitosan-coated NEs.

Surface tension is an important physicochemical formulation parameter that determines spreading of a formulation across the ocular surface and also influences capillary drainage through the nasolacrimal

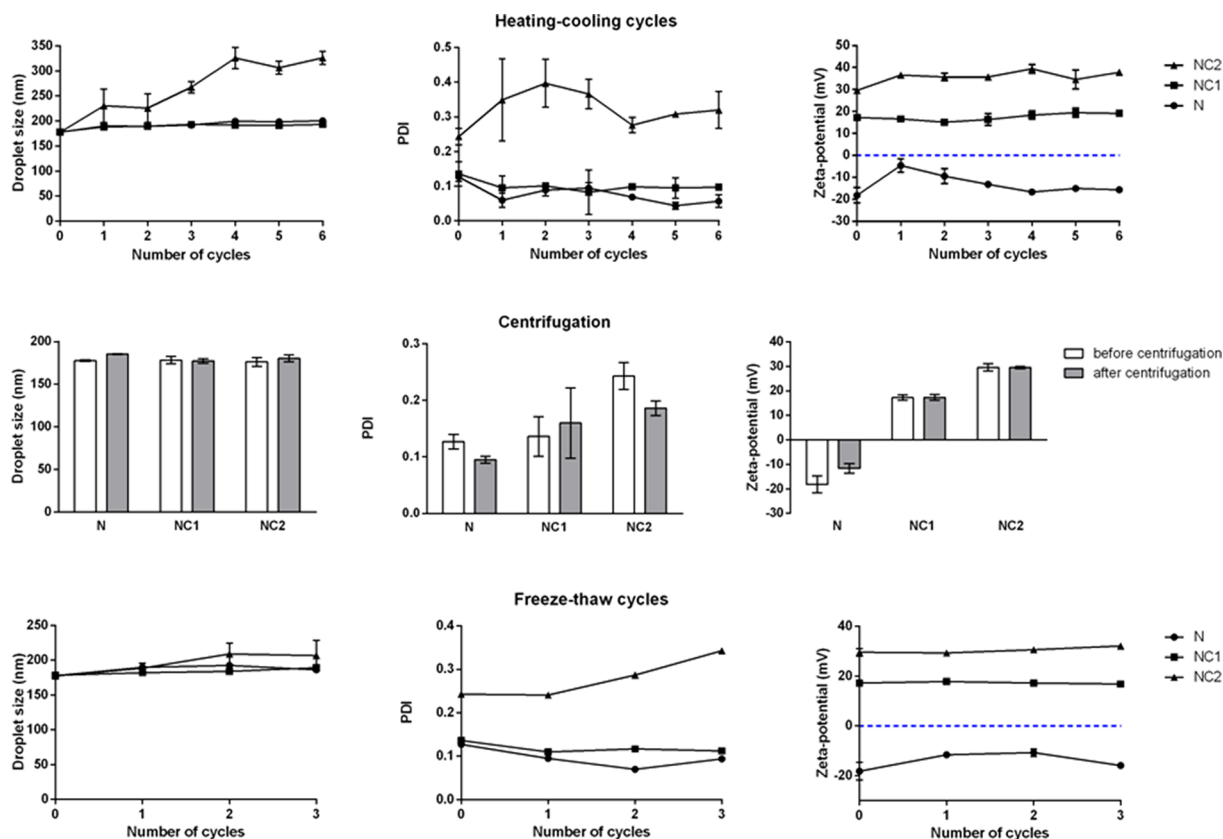


Fig. 3. Droplet size, PDI and zeta-potential of chitosan-coated NEs with 0.05 (NC1) and 0.3 (NC2) % (w/w) chitosan, and the uncoated control formulation (N) measured before and after stress tests (heating-cooling cycles, centrifugation and freeze-thaw cycles). Data are expressed as mean \pm SD ($n = 2-3$).

Table 5
The final NE composition.

Formulation	Ibuprofen (% w/w)	Chitosan LM _w (% w/w)	Miglyol® 812 (% w/w)	Lecithin (% w/w)	Kolliphor® EL (% w/w)	Glycerol (% w/w)	Water (% w/w)
N	–	–	2.5	0.05	0.25	2.5	94.7
IN	0.2	–	2.5	0.05	0.25	2.5	94.5
NC1	–	0.05	2.5	0.05	0.25	2.5	94.65
INC1	0.2	0.05	2.5	0.05	0.25	2.5	94.45
NC2	–	0.3	2.5	0.05	0.25	2.5	94.4
INC2	0.2	0.3	2.5	0.05	0.25	2.5	94.2

ducts, affecting precorneal residence time of the instilled formulation. All the surface tension measurements were carried out at the eye drop application temperature, i.e. 25 °C, to be comparable with the tear film surface tension values reported, which were also measured at 25 °C. Chitosan and ibuprofen both induced a decrease in the formulation surface tension (Table 6). Surface active properties of chitosan are well-known, as it can be used as an O/W emulsion stabilizer (Payet and Terentjev, 2008). Ibuprofen surface active properties have also been confirmed (Baydoun et al., 2004; Rao et al., 1992) and are probably the reason for additional surface tension decrease when ibuprofen was introduced to the chitosan-coated NEs. The surface tension at the air interface of the precorneal tear film has physiological range of 40–46 mN m⁻¹, while in DED the characteristic range is approximately 44–53 mN m⁻¹ (Nagyova and Tiffany, 1999). In general, higher surface tension values coincide with lower tear film stability, but the scarce literature data reported that the eye drops with a surface tension below 35 mN m⁻¹ are painful and uncomfortable (Hotujac Grgurevic et al., 2017; Ludwig and Reimann, 2015). Higher concentration of chitosan in the INC2 formulation pushed the surface tension slightly below this limit.

Viscosity profile as the function of the applied shear showed a Newtonian fluid behavior of the NEs. The measured viscosity values were similar to the viscosity of water, with a slight increase with the addition of chitosan (1.1–4.1 mPa s, Table 6). The measured viscosity values were in the physiological range of a human tear film (1–9 mPa s) (Pandit et al., 1999; Tiffany, 1991), which has been proposed as the desirable viscosity range for the artificial tears that follow Newtonian behaviour (Acar et al., 2018). Moreover, low formulation viscosity enables dosing accuracy and ease of eye-drop administration.

Tear film hyperosmolarity plays etiological role in DED and osmoprotectants could provide necessary protection of cells under extreme osmotic stress by balancing the osmotic pressure without disturbing cell metabolism (Jones et al., 2017). Osmolarity of all ibuprofen-loaded NEs was in the osmolarity range of a normal tear film (Table 6), i.e. between 270 and 315 mOsm kg⁻¹ (Willcox et al., 2017).

After 30-day storage at 4 °C INC1 and the control chitosan-uncoated formulation IN showed only a minor droplet size increase of 8.2 and 5.3 nm, respectively, while PDI and zeta-potential values remained unchanged or very similar (INC1: 0.127 ± 0.016, 22.8 ± 2.3 mV; IN: 0.101 ± 0.008, -12.2 ± 1.8 mV). However, a significant droplet size increase of 35.3 nm (18%) was noted for INC2 formulation, while its PDI and zeta-potential remained quite similar to those of the freshly-prepared INC2 formulation (0.323 ± 0.034, 38.9 ± 1.4). Overall, it seems that the addition of ibuprofen caused a detectable instability of the INC2 formulation. On the contrary, stability of the INC1 formulation with lower chitosan concentration was not compromised. The pH of all the formulations remained practically unchanged after 30-day storage at 4 °C (data not shown).

Altogether, the results obtained from physicochemical characterization pointed out INC1 as the formulation with all the physicochemical properties within the acceptable range for ophthalmic use. The INC1 droplet size, zeta-potential, viscosity, osmolarity and surface tension resemble the values reported for NEs produced using Novasorb® technology (Lallemant et al., 2012). In addition, the INC1 formulation was found to be stable under all the experimental conditions tested.

3.3. Sterilization

Sterility is a basic requirement for ophthalmic NEs and filtration and/or autoclavation are usually used for sterilization of the final product. Clearly, elevated temperatures during the autoclavation, can seriously affect the final NE physicochemical characteristics. Autoclavation can cause hydrolysis of some lipids and lecithins, resulting in liberation of free fatty acids, which can compromise NE stability. Furthermore, it has already been reported that the autoclaving process can lead to destabilization of chitosan-coated lipid emulsions (Jumaa and Muller, 1999), which could be explained by temperature induced chitosan interchain crosslinking involving the amino groups (Lim et al., 1999). Indeed, autoclavation of the chitosan-coated NEs (NC1, NC2, INC1 and INC2) at 121 °C during 20 min resulted in meaningful changes in both physicochemical properties (increase in droplet size and PDI, reduction of zeta-potential, Fig. 4) and visual appearance (change in color and creaming). In contrast, NEs without chitosan (N and IN) showed satisfying stability after the autoclaving process regarding their droplet size, PDI and zeta-potential. However, filtration of chitosan-coated NEs through PES filters with 0.2 µm pore size did not affect any of the parameters tested (Fig. 4), as reported previously (Gue et al., 2016). Therefore, the final chitosan-coated NEs can be easily sterilized by aseptic filtration through a sterilizing membrane into a sterile suite (Floyd, 1999), without the need for aseptic preparation procedure.

3.4. *In vitro* ibuprofen release

In general, drug release from a NE involves partitioning of the drug from the oil droplets into the surfactant layer and then into the aqueous phase (Singh et al., 2017). While diffusing out from the oil, the drug comes in contact with the surrounding aqueous media and depending on its solubility and the volume of the aqueous media it can undergo nanoprecipitation. Biorelevant methods for *in vitro* release testing of ophthalmic products are still in development (Jug et al., 2018). *In vitro* drug release from nano-sized ophthalmic delivery system is currently assessed using a variety of membrane diffusion techniques including simple dialysis methods, dialysis methods using modified Apparatus 1 or 2 as well as Franz diffusion cells (Jug et al., 2018). We chose a dialysis method using modified Apparatus 2, and since the concentration of ibuprofen present in the NE formulations exceeds ibuprofen water solubility (Hussain et al., 2018), a commercially available ibuprofen oral suspension (20 mg mL⁻¹; Neofen®, Belupo, Croatia), diluted with double-distilled water to the appropriate concentration, and ibuprofen oil (Miglyol® 812) solution were used as controls. The obtained *in vitro* release profiles are shown in Fig. 5. About 90% of ibuprofen was released from the NEs in 120 min. The t_{50%} of IN, INC1 and INC2 was 30, 35 and 41 min, respectively. Unsurprisingly, ibuprofen release was significantly faster from the NE formulations than from the ibuprofen suspension (t_{50%} = 68 min; f₂ < 45) and oil solution (t_{50%} = 94 min; f₂ < 30), due to the large total nanodroplet surface area available for drug diffusion in the NEs. Such a release profile could be beneficial regarding the limited drug residence at the ocular surface. The addition of chitosan to the NE formulation seemed to slightly slow down ibuprofen release, but the statistical significance was confirmed only

Table 6
Ibuprofen-loaded NEs characterized in terms of droplet size, PDI, zeta-potential, entrapment efficiency, pH, viscosity, osmolality and surface tension.

Formulation	Droplet size (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)	Entrapment efficiency (%)	pH	Viscosity (mPas)	Osmolality (mOsm kg ⁻¹)	Surface tension (mN m ⁻¹)
IN	172.5 ± 0.4 (177.8 ± 1.1)	0.116 ± 0.017 (0.127 ± 0.013)	-15.6 ± 0.2 (-18.2 ± 3.5)	98.24 ± 0.10	4.42 ± 0.04 (5.83 ± 0.05)	1.1 ± 0 (1.1 ± 0.1)	271.0 ± 18.5 (275.5 ± 15.6)	38.9 ± 0.7 (42.4 ± 0.5)
INC1	175.1 ± 1.1 (183.9 ± 1.2)	0.127 ± 0.013 (0.114 ± 0.006)	24.6 ± 0.4 (18.0 ± 1.7)	98.73 ± 0.03	4.41 ± 0.03 (4.49 ± 0.01)	1.9 ± 0.1 (1.8 ± 0)	300.3 ± 1.0 (298.5 ± 1.3)	35.7 ± 0.3 (38.0 ± 0.7)
INC2	192.4 ± 28.9 (177.4 ± 2.6)	0.295 ± 0.120 (0.243 ± 0.024)	36.8 ± 2.0 (29.6 ± 1.5)	98.86 ± 0.01	4.42 ± 0.01 (4.39 ± 0.05)	4.1 ± 0.4 (4.0 ± 0.2)	291.5 ± 20.2 (316.5 ± 1.7)	34.5 ± 0.2 (39.4 ± 0.4)

Values are mean ± SD (n ≥ 3); values in brackets refer to ibuprofen-free formulations.

between IN and INC2 formulations ($f_2 = 48$). This could be explained by localisation of chitosan molecules on the NE droplet surface, forming a certain barrier to ibuprofen release.

3.5. Chitosan-coated NE mucoadhesive properties

Mucoadhesive interactions between chitosan and mucin are complex and involve electrostatic attraction, hydrogen bonding, and hydrophobic effects (Sogias et al., 2008). The relative contributions of each physical interaction depend on the pH and ionic strength of the surrounding medium (Ding et al., 2019). Mucoadhesive properties of the chitosan-coated NEs were assessed by determining rheological behavior of mixtures of mucin dispersions in STF with the NE formulations (Hassan and Gallo, 1990). In this method, NEs were mixed with mucin dispersion in STF and a synergistic viscosity increase caused by interactions between NEs and mucin chains was recorded and calculated as η_b , according to Eq. (2). Interestingly, even anionic NE without chitosan (IN) showed mucoadhesive behavior, as the calculated η_b value was around 30 mPa s (Fig. 6). Chitosan-coated INC1 and INC2 formulations, on the other hand, showed significantly stronger mucoadhesion (INC1: P = 0.0210; INC2: P = 0.0184), having η_b of around 48 mPas, due to the well-known electrostatic interactions between positively charged chitosan molecules and negatively charged mucin chains (Sogias et al., 2008). However, there was no statistically significant difference between η_b of INC1 and INC2 formulations (P = 0.9927), indicating that higher chitosan concentration was not able to augment the effect of mucoadhesion of the NEs tested within this research.

3.6. Biocompatibility studies

3.6.1. In vitro corneal biocompatibility

An important aspect of topical ophthalmic formulation characterization is the investigation of formulation biocompatibility with the corneal epithelium. Although biocompatibility of chitosan is well-known, and it has been widely used in nanosystems investigated for topical ocular application, a concentration-dependent toxicity effect has been reported (de la Fuente et al., 2010; Diebold et al., 2007). Also, surfactants are able to non-specifically partition into the plasma membrane causing membrane fluidization, which is associated with the concentration-dependent increase in permeability but also toxicity, due to epithelial abrasion (Brayden et al., 2014). Even though surfactants have a long history of use in ophthalmic drug delivery and in this study surfactants normally present in the tear film as well as other ophthalmically acceptable formulation components were used, safety has to be evaluated *in vitro*. The most extensively characterized human-derived cell line used in corneal biocompatibility and transcorneal permeability studies is the immortalized human corneal epithelial cell line (HCE-T) (Juretic et al., 2017). The majority of *in vitro* biocompatibility screenings is currently undertaken using cells cultured in a two-dimensional (2D) environment (Fitzgerald et al., 2015). However, this does not accurately reflect the three-dimensional (3D) structure of corneal epithelium. The use of inadequate experimental tools can lead to wrong conclusions about formulation biocompatibility (Krtalic et al., 2018). Using 3D cell-based models it is possible to predict biocompatibility *in vivo* more closely than with the conventional 2D models because 3D models have more realistic representation of the tissue complexity, including drug, oxygen and nutrient gradients. Therefore, to test corneal epithelium biocompatibility we employed 3D HCE-T cell-based model. HCE-T corneal model viability was evaluated by colorimetric MTT assay after 30-min incubation with the NE samples and it was expressed as the percentage of mitochondrial dehydrogenase activity, using the cells treated with HBSS as the reference point (100% of mitochondrial dehydrogenase activity). As it can be seen from Fig. 7, the viability of the cells treated with ibuprofen suspension (IBU S) decreased to about 85%, which is significantly lower than the viability of

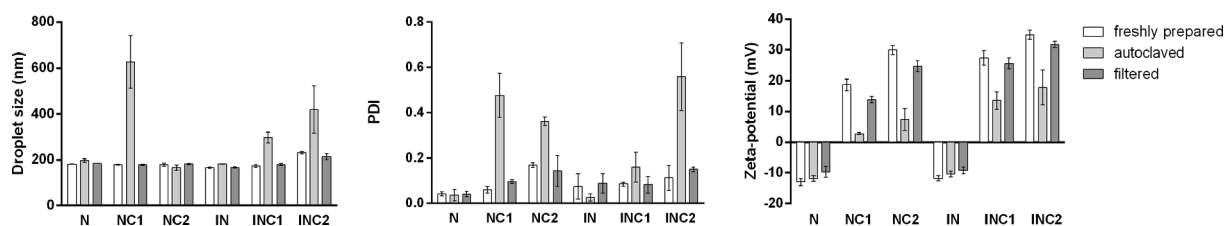


Fig. 4. Droplet size, PDI and zeta-potential of chitosan-coated NEs with 0.05% (*w/w*) chitosan and loaded with ibuprofen (INC1) or ibuprofen free (NC1), chitosan-coated NEs with 0.3% (*w/w*) chitosan and loaded with ibuprofen (INC2) or ibuprofen free (NC2), the uncoated control formulation loaded with ibuprofen (IN) or ibuprofen free (N) measured before and after autoclaving (121 °C/20 min) or filtration (PES; 0.2 μm). Data are expressed as mean ± SD (*n* = 2).

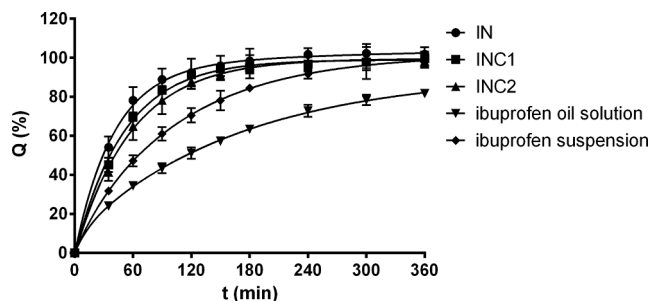


Fig. 5. *In vitro* release profiles of ibuprofen from chitosan-coated NEs with 0.05 (INC1) and 0.3 (INC2) % (*w/w*) chitosan, the uncoated control formulation (IN) and respective controls (ibuprofen oil solution and ibuprofen suspension) tested during 6 h (360 min) in phosphate buffer pH 7.4 at 34 °C. Data are expressed as mean ± SD (*n* = 3–6).

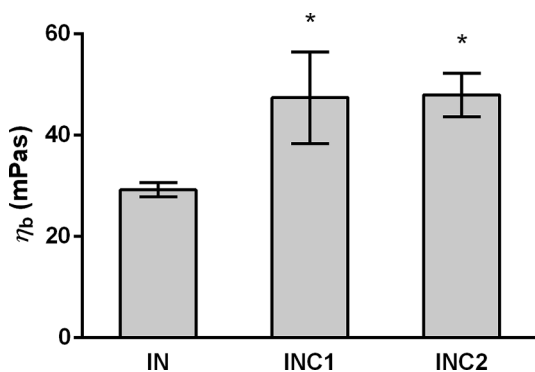


Fig. 6. Mucoadhesive properties of ibuprofen-loaded NEs determined rheologically after mixing with 20% (*w/w*) mucin dispersion in STF, expressed as the viscosity component due to bioadhesion (η_{sp}). Data are expressed as mean ± SD (*n* = 3). *Differs from the uncoated IN formulation (*P* < 0.05).

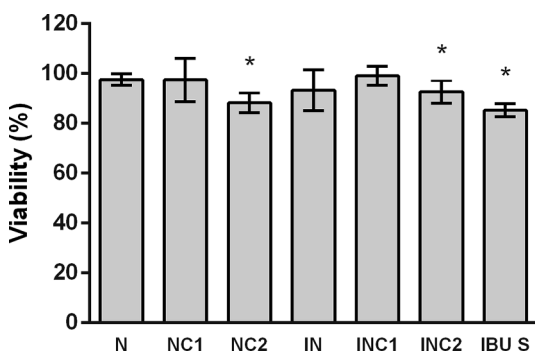


Fig. 7. *In vitro* 3D HCE-T model viability (%) determined by MTT assay after 30-min incubation with NE formulations (or ibuprofen suspension; IBU S) diluted 10 times (*V/V*) in HBSS pH 6.0. The cells incubated in HBSS pH 6.0 were used as control of 100% cell viability. Data are expressed as mean ± SD (*n* = 6). *Differs from the control (*P* < 0.05).

the control cells (*P* = 0.0004). Ibuprofen loaded formulations IN and INC1 (and the unloaded control formulations N and NC1), on the other hand, did not significantly affect viability of the cells. This can be explained by ibuprofen encapsulation into the oil nanodroplets, hindering its direct toxicity effect on the cells. However, the formulation INC2 and the control unloaded formulation NC2 showed significantly lower cell viability of 93% (*P* = 0.0365) and 88% (*P* = 0.0004), respectively. Taking everything into account, this small but significant viability decrease could be ascribed to higher concentration of chitosan (0.3%, *w/w*) in INC2 and NC2 formulations, which is in agreement with previously reported concentration-dependent toxicity of chitosan (Diebold et al., 2007).

3.6.2. *Ex vivo* corneal biocompatibility

To confirm the data obtained from the *in vitro* model, biocompatibility was also tested on the *ex vivo* model using freshly excised porcine corneas. The corneas were incubated with NEs during 5 and 15 min and the extent of corneal damage was evaluated visually using fluorescein solution and a cobalt blue lamp, since fluorescein staining is a well-known measure of corneal epithelial cell damage (Prinsen and Koeter, 1993). Photographs were taken after each incubation time point and they are shown in Fig. 8. While PBS (negative control) and ibuprofen suspension (IBU S; 0.2%, *w/V*) did not cause corneal epithelial damage, an intense staining was observed after incubation with 0.1 M NaOH solution and acetone (positive controls). Fluorescein staining was also observed on BAK treated corneas after 15-min incubation. BAK was applied as 0.025% (*w/V*) solution in PBS, since it is the highest concentration approved in the eye drops (FDA Database: Inactive ingredients). It can clearly be seen that IN and INC1 formulations did not cause any changes on the corneal surface since no fluorescein staining was detected, but the INC2 formulation caused a mild fluorescein staining after 15-min incubation, which is in agreement with the *in vitro* studies performed.

3.7. Conclusions

Herein we propose chitosan-coated NEs for improved NSAIDs delivery in the treatment of mild-to-moderate DED. The results of our study pointed out INC1 as the lead formulation, having physicochemical properties inside the appropriate range for ophthalmic application, adequate stability and the possibility to be easily sterilized after preparation. Also, the proposed formulation has significant mucoadhesive character, as confirmed by the *in vitro* studies, and excellent biocompatibility, which was tested on two models, namely 3D HCE-T cell-based model and *ex vivo* model using fresh porcine corneas. Development of formulations with prolonged residence at the ocular surface would enable reduction of the required NSAID dose providing better benefit-risk balance of future ophthalmic drug products. In addition, ibuprofen-free NC1 formulation could also be used as a drug-free vehicle (artificial tears) for symptomatic treatment of mild-to-moderate DED. However, further *in vivo* studies are necessary to confirm these conclusions.

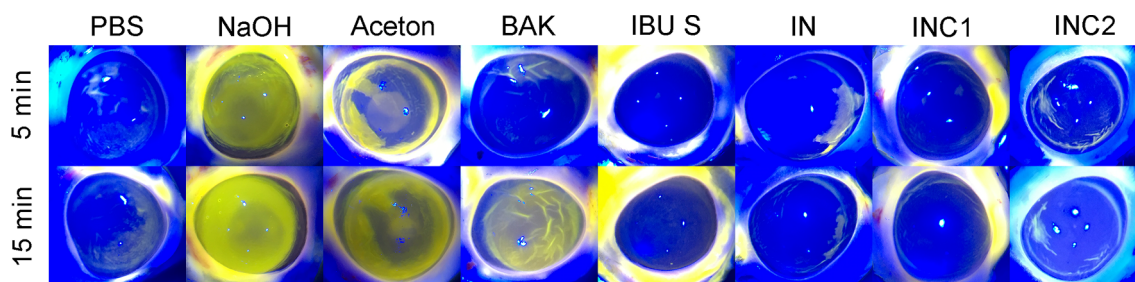


Fig. 8. Representative photographs of *ex vivo* model of porcine corneas captured after 5 and 15-minute treatment with ibuprofen-loaded NEs (IN, INC1 and INC2) or control samples (PBS pH 7.4, 0.1 M NaOH, acetone, 0.025%, w/v benzalkonium chloride solution (BAK) and 0.2%, w/v ibuprofen suspension (IBU S)) and subsequent fluorescein staining with the aid of a cobalt-blue lamp used to intensify the fluorescence signal ($n \geq 4$).

CRedit authorship contribution statement

Bisera Jurišić Dukovski: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Marina Juretić:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Danka Bračko:** Methodology, Writing - review & editing. **Danijela Randjelović:** Data curation, Formal analysis. **Snežana Savić:** Writing - review & editing. **Mario Crespo Moral:** Methodology. **Yolanda Diebold:** Writing - review & editing. **Jelena Filipović-Grčić:** Funding acquisition, Writing - review & editing. **Ivan Pepić:** Methodology, Writing - review & editing. **Jasmina Lovrić:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This work was supported by the project entitled Topical nanodelivery systems funded by the University of Zagreb (Z169), the project “Modelling of the Pharmaceutical Spray Drying Process of the Emulsions in Laboratory and Pilot Scale” in collaboration with the industrial partner PLIVA Croatia Ltd., and Spanish Government Grant RTI2018-094071-B-C21 (MCIU/AEI/FEDER, UE) (YD and MC-M). Bisera Jurišić Dukovski was a recipient of a PhD fellowship from the Croatian Science Foundation (programme Young researchers' career development project—training of new doctoral students). Mario Crespo Moral was a recipient of the Regional JCyL Scholarship/European Social Fund Program ORDEN EDU/128/2015 and University of Valladolid Mobility Program (2017).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118979>.

References

- Acar, D., Molina-Martinez, I.T., Gomez-Ballesteros, M., Guzman-Navarro, M., Benitez-Del-Castillo, J.M., Herrero-Vanrell, R., 2018. Novel liposome-based and in situ gelling artificial tear formulation for dry eye disease treatment. *Cont. Lens. Anterior. Eye* 41, 93–96.
- Baudouin, C., Aragona, P., Messmer, E.M., Tomlinson, A., Calonge, M., Boboridis, K.G., Akova, Y.A., Geerling, G., Labetoulle, M., Rolando, M., 2013. Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting. *Ocul. Surf.* 11, 246–258.
- Baydoun, L., Duvel, A., Daniels, R., Drust, A., Goldhagen, T., Schwan, I., Zeidler, C.,

- Muller-Goymann, C.C., 2004. Comparison of different ibuprofen-amino acid compounds with respect to emulsifying and cytotoxic properties. *Int. J. Pharm.* 274, 157–165.
- Benelli, U., 2011. Systane lubricant eye drops in the management of ocular dryness. *Clin. Ophthalmol.* 5, 783–790.
- Brayden, D.J., Gleeson, J., Walsh, E.G., 2014. A head-to-head multi-parametric high content analysis of a series of medium chain fatty acid intestinal permeation enhancers in Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 830–839.
- Bron, A.J., de Paiva, C.S., Chauhan, S.K., Bonini, S., Gabison, E.E., Jain, S., Knop, E., Markoulli, M., Ogawa, Y., Perez, V., Uchino, Y., Yokoi, N., Zoukhri, D., Sullivan, D.A., 2017. TFOS DEWS II Pathophysiology report. *Ocul. Surf.* 15, 438–510.
- Craig, J.P., Nichols, K.K., Akpek, E.K., Caffery, B., Dua, H.S., Joo, C.K., Liu, Z., Nelson, J.D., Nichols, J.J., Tsubota, K., Stapleton, F., 2017. TFOS DEWS II definition and classification report. *Ocul. Surf.* 15, 276–283.
- Dauil, P., Lallemand, F., Garrigue, J.S., 2014. Benefits of cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 66, 531–541.
- de la Fuente, M., Ravina, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., Alonso, M.J., 2010. Chitosan-based nanostructures: a delivery platform for ocular therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 100–117.
- Dean, A.W., Glasgow, B.J., 2012. Mass spectrometric identification of phospholipids in human tears and tear lipocalin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1773–1782.
- Diaz, D.A., Colgan, S.T., Langer, C.S., Bandi, N.T., Likar, M.D., Van Alstine, L., 2016. Dissolution similarity requirements: how similar or dissimilar are the global regulatory expectations? *AAPS J.* 18, 15–22.
- Diebold, Y., Jarrin, M., Saez, V., Carvalho, E.L., Orea, M., Calonge, M., Seijo, B., Alonso, M.J., 2007. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials* 28, 1553–1564.
- Ding, L., Huang, Y., Cai, X., Wang, S., 2019. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. *Carbohydr. Polym.* 208, 133–141.
- Fialho, S.L., da Silva-Cunha, A., 2004. New vehicle based on a microemulsion for topical ocular administration of dexamethasone. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 32, 626–632.
- Fitzgerald, K.A., Malhotra, M., Curtin, C.M., FJ, O.B., CM, O.D., 2015. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J. Control Release* 215, 39–54.
- Floyd, A.G., 1999. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *Pharm. Sci. Technol. Today* 4, 134–143.
- Gan, L., Wang, J., Jiang, M., Bartlett, H., Ouyang, D., Eperjesi, F., Liu, J., Gan, Y., 2013. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov. Today* 18, 290–297.
- Gue, E., Since, M., Ropars, S., Herbinet, R., Le Pluart, L., Malzert-Freon, A., 2016. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int. J. Pharm.* 498, 49–65.
- Hafner, A., Lovric, J., Voinovich, D., Filipovic-Grčić, J., 2009. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 381, 205–213.
- Hassan, E.E., Gallo, J.M., 1990. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharm. Res.* 7, 491–495.
- Hotujac Grgurevic, M., Juretic, M., Hafner, A., Lovric, J., Pepic, I., 2017. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 43, 275–282.
- Hussain, A., Smith, G., Khan, K.A., Bukhari, N.I., Pedge, N.I., Ermolina, I., 2018. Solubility and dissolution rate enhancement of ibuprofen by co-milling with polymeric excipients. *Eur. J. Pharm. Sci.* 123, 395–403.
- Jones, L., Downie, L.E., Korb, D., Benitez-Del-Castillo, J.M., Dana, R., Deng, S.X., Dong, P.N., Geerling, G., Hida, R.Y., Liu, Y., Seo, K.Y., Tauber, J., Wakamatsu, T.H., Xu, J., Wolffsohn, J.S., Craig, J.P., 2017. TFOS DEWS II management and therapy report. *Ocul. Surf.* 15, 575–628.
- Jug, M., Hafner, A., Lovric, J., Kregar, M.L., Pepic, I., Vanic, Z., Cetina-Cizmek, B., Filipovic-Grčić, J., 2018. An overview of in vitro dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147, 350–366.
- Jumaa, M., Muller, B.W., 1999. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. *Int. J. Pharm.* 183, 175–184.
- Juretic, M., Jurisic Dukovski, B., Krtalic, I., Reichl, S., Cetina-Cizmek, B., Filipovic-Grčić, J., Lovric, J., Pepic, I., 2017. HCE-T cell-based permeability model: a well-maintained or a highly variable barrier phenotype? *Eur. J. Pharm. Sci.* 104, 23–30.
- Khurana, A.K., Chaudhary, R., Ahluwalia, B.K., Gupta, S., 1991. Tear film profile in dry

- eye. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 69, 79–86.
- Kinnunen, K., Kauppinen, A., Piippo, N., Koistinen, A., Toropainen, E., Kaarniranta, K., 2014. Cationorm shows good tolerability on human HCE-2 corneal epithelial cell cultures. *Exp. Eye Res.* 120, 82–89.
- Klang, V., Valenta, C., 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21.
- Krtalic, I., Radosevic, S., Hafner, A., Grassi, M., Nenadic, M., Cetina-Cizmek, B., Filipovic-Grcic, J., Pepic, I., Lovric, J., 2018. D-Optimal design in the development of rheologically improved in situ forming ophthalmic gel. *J. Pharm. Sci.* 107, 1562–1571.
- Lallemant, F., Daull, P., Benita, S., Buggage, R., Garrigue, J.S., 2012. Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, novasorb. *J. Drug Deliv.* 2012, 604204.
- Lallemant, F., Schmitt, M., Bourges, J.L., Gurny, R., Benita, S., Garrigue, J.S., 2017. Cyclosporine A delivery to the eye: a comprehensive review of academic and industrial efforts. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 117, 14–28.
- Lalu, L., Tamba, V., Pradhan, D., Nayak, K., Bagchi, S., Maheshwari, R., Kalia, K., Tekade, R.K., 2017. Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: current paradigms and future research directions. *J. Control. Release* 268, 19–39.
- Lang, J.C., Roehrs, R.E., Jani, R., 2005. Ophthalmic preparations. In: Troy, D.B., Beringer, P. (Eds.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed. LippincottWilliamsWilkins, Philadelphia, PA, USA, pp. 861–862.
- Li, J., Hwang, I.-C., Chen, X., Park, H.J., 2016. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids* 60, 138–147.
- Lim, L.Y., Khor, E., Ling, C.E., 1999. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *J. Biomed. Mater. Res.* 48, 111–116.
- Ludwig, A., Reimann, H., 2015. Eye. In: Bouwman-Boer, Y., Fenton-May, V., Le Brun, P. (Eds.), *Practical Pharmaceutics*. KNMP and Springer International, Ny, pp. 163–188.
- McCulley, J.P., Shine, W., 1997. A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 95, 79–88 discussion 88–93.
- Meleson, K., Graves, S., Mason, T.G., 2004. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. *Soft Mater.* 2, 109–123.
- Mun, S., Decker, E.A., McClements, D.J., 2006. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 296, 581–590.
- Nagyova, B., Tiffany, J.M., 1999. Components responsible for the surface tension of human tears. *Curr. Eye Res.* 19, 4–11.
- Nguyen, S., Hisiger, S., Jolicoeur, M., Winnik, F.M., Buschmann, M.D., 2009. Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and ¹H NMR after semi-preparative SEC. *Carbohydr. Polym.* 75, 636–645.
- Norn, M.S., 1988. Tear fluid pH in normals, contact lens wearers, and pathological cases. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 66, 485–489.
- Pandit, J.C., Nagyova, B., Bron, A.J., Tiffany, J.M., 1999. Physical properties of stimulated and unstimulated tears. *Exp. Eye Res.* 68, 247–253.
- Pauly, A., Meloni, M., Brignole-Baudouin, F., Warnet, J.M., Baudouin, C., 2009. Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride: early detection of toxic damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1644–1652.
- Payet, L., Terentjev, E.M., 2008. Emulsification and stabilization mechanisms of o/w emulsions in the presence of chitosan. *Langmuir* 24, 12247–12252.
- Prinsen, M.K., Koeter, H.B., 1993. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem. Toxicol.* 31, 69–76.
- 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.* 538, 215–222.
- Rai, V.K., Mishra, N., Yadav, K.S., Yadav, N.P., 2018. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J. Control. Release* 270, 203–225.
- Rao, C.S., Schoenwald, R.D., Barfknecht, C.F., Laban, S.L., 1992. Biopharmaceutical evaluation of ibufenac, ibuprofen, and their hydroxyethoxy analogs in the rabbit eye. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 20, 357–388.
- Rinaudo, M., 2016. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632.
- Saville, J.T., Zhao, Z., Willcox, M.D., Ariyavidana, M.A., Blanksby, S.J., Mitchell, T.W., 2011. Identification of phospholipids in human meibum by nano-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Exp. Eye Res.* 92, 238–240.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Ali, M., 2007. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 227–243.
- Shine, W.E., McCulley, J.P., 1998. Keratoconjunctivitis sicca associated with meibomian secretion polar lipid abnormality. *Arch. Ophthalmol.* 116, 849–852.
- Simmons, P.A., Vehige, J.G., 2007. Clinical performance of a mid-viscosity artificial tear for dry eye treatment. *Cornea* 26, 294–302.
- 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. Control. Release* 252, 28–49.
- Sogias, I.A., Williams, A.C., Khutoryanskiy, V.V., 2008. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules* 9, 1837–1842.
- Stevenson, D., Tauber, J., Reis, B.L., 2000. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology* 107, 967–974.
- Subrizi, A., Del Amo, E.M., Korzhikov-Vlakh, V., Tennikova, T., Ruponen, M., Urtti, A., 2019. Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties. *Drug Discov. Today*.
- Tamilvanan, S., Benita, S., 2004. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 357–368.
- Teixeira, H.F., Bruxel, F., Fraga, M., Schuh, R.S., Zorzi, G.K., Matte, U., Fattal, E., 2017. Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. *Int. J. Pharm.* 534, 356–367.
- Tiffany, J.M., 1991. The viscosity of human tears. *Int. Ophthalmol.* 15, 371–376.
- Trotta, M., Pattarino, F., Ignoni, T., 2002. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 203–208.
- Uluata, S., Decker, E.A., McClements, D.J., 2016. Optimization of nanoemulsion fabrication using microfluidization: role of surfactant concentration on formation and stability. *Food Biophys.* 11, 52–59.
- Walenga, R.L., Babiskin, A.H., Zhang, X., Absar, M., Zhao, L., Lionberger, R.A., 2019. Impact of vehicle physicochemical properties on modeling-based predictions of cyclosporine ophthalmic emulsion bioavailability and tear film breakup time. *J. Pharm. Sci.* 108, 620–629.
- Willcox, M.D.P., Argueso, P., Georgiev, G.A., Holopainen, J.M., Laurie, G.W., Millar, T.J., Papas, E.B., Rolland, J.P., Schmidt, T.A., Stahl, U., Suarez, T., Subbaraman, L.N., Ucakhan, O.O., Jones, L., 2017. TFOS DEWS II tear film report. *Ocul. Surf.* 15, 366–403.
- Yamada, M., Kawai, M., Mochizuki, H., Hata, Y., Mashima, Y., 1998. Fluorophotometric measurement of the buffering action of human tears in vivo. *Curr. Eye Res.* 17, 1005–1009.