

# Ispitivanje stabilnosti oftalmičkih nanoemulzija pri uvjetima simulirane izmjene suza

---

Cepetić, Dorja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:815808>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Dorja Cepetić**

**Ispitivanje stabilnosti oftalmičkih nanoemulzija  
pri uvjetima simulirane izmjene suza**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasmini Lovrić na prenesenom znanju tijekom akademskog obrazovanja te na pruženoj prilici i iznimnom trudu i savjetovanju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala dr. sc. Biseri Jurišić Dukovski i asistentu Josipu Ljubici, mag. pharm., na pomoći, pristupačnosti i savjetima tijekom eksperimentalnog rada na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju.*

*Hvala mojim prijateljima koji su mi pomogli na svakom koraku mog studija, bili strpljivo uz mene u najtežim trenucima i uvijek me poticali na trud i napredak. Bez vas ne bih uspjela.*

*Posebno hvala mojoj divnoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i povjerenju i na svakodnevnom dozama smijeha i zagrljaja. Hvala vam što ste me svojim primjerom oblikovali u osobu koja jesam.*

*Hvala mom Kreši, mom čudu.*

# SADRŽAJ

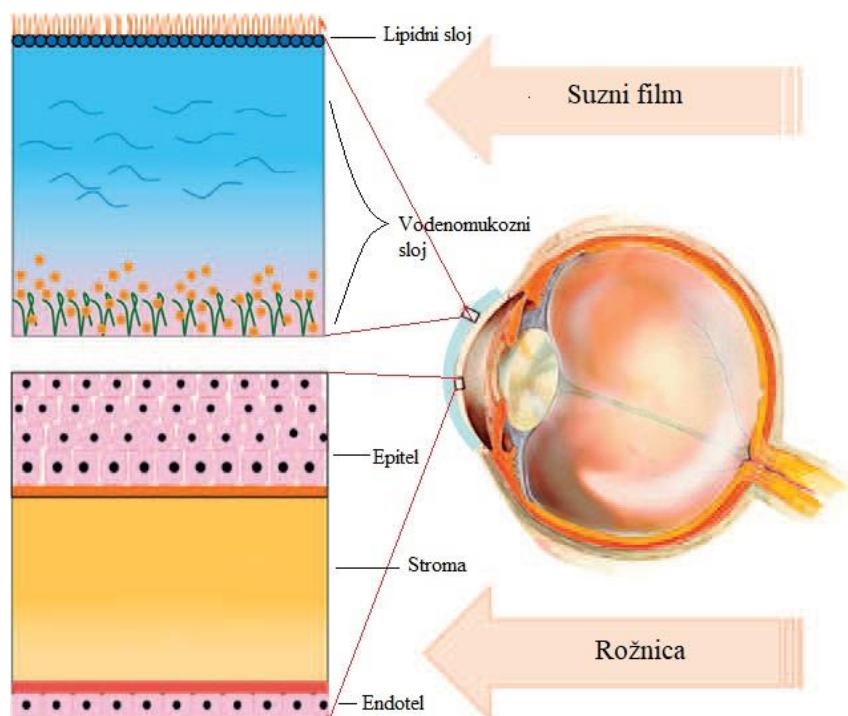
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. BOLEST SUHOG OKA .....	1
1.1.1. Etiologija i patofiziologija bolesti suhog oka.....	1
1.1.2. Trenutni terapijski pristup bolesti suhog oka .....	3
1.2. NANOEMULZIJE .....	4
1.2.1. Nanoemulzije za oftalmičku primjenu .....	4
1.2.2. Sastav nanoemulzija.....	5
1.2.3. Metode pripreme nanoemulzija.....	8
1.2.4. Svojstva nanoemulzija.....	10
1.2.5. Stabilnost nanoemulzija .....	13
1.2.6. Nanoemulzije u kontaktu s okom.....	14
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	16
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	18
3.1. Materijali .....	18
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Priprava nanoemulzija.....	18
3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti (PDI) nanoemulzija.....	19
3.2.3. Mjerenje zeta-potencijala nanoemulzija.....	20
3.2.4. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija u uvjetima simulirane izmjene suza .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	22
4.1. Utjecaj razrjeđenja na veličinu i raspodjelu veličina kapljica nanoemulzije.....	22
4.2. Utjecaj razrjeđenja na zeta-potencijal kapljica nanoemulzije .....	24
4.3. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija u uvjetima simulirane izmjene suza.....	25
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	29
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	30
<b>7. LITERATURA</b> .....	31
<b>8. SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	34

# 1. UVOD

## 1.1. BOLEST SUHOG OKA

### 1.1.1. Etiologija i patofiziologija bolesti suhog oka

Bolest suhog oka multifaktorijalna je bolest karakterizirana gubitkom homeostaze i hiperosmolalnošću suznog filma te posljedičnim upalnim procesima na površini oka (Jurišić Dukovski, 2021; Craig i sur., 2017). Na površini oka zraku su izloženi epitel rožnice te epitel bulbarne spojnice, koje prekriva suzni film. Suzni film hrani i vlaži rožnicu te pruža zaštitu od patogena jer sadrži lizozime, a sastoji se od vodenomukoznog sloja gela i lipidnog sloja suznog filma (Jurišić Dukovski, 2021; Willcox i sur., 2017). Vodenomukozni sloj gela u kontaktu je s epitelom rožnice i spojnice, a čine ga vodena komponenta, koju izlučuju suzne žlijezde, te mali topljivi mucini, mucini koji tvore gel i transmembranski mucini. Sekretorne mucine izlučuju vrčaste stanice spojnice te oni stabiliziraju suzni film i potpomažu širenje suznog filma po površini oka, smanjujući njegovu površinsku napetost. Lipidni sloj suznog filma tvori lipofilni meibum kojeg luče Meibomove žlijezde te on usporava isparavanje vodene komponente suznog filma. Interakcija lipidnog i vodenomukoznog sloja stabilizira suzni film (Jurišić Dukovski, 2021; Willcox i sur., 2017).



Slika 1. Građa površine oka (preuzeto i prilagođeno prema Gan i sur., (2013) uz dopuštenje izdavača Elsevier).

Bolest suhog oka može biti uzrokovana pretjeranim isparavanjem suza (hiperevaporacijski tip) ili preslabim izlučivanjem suza (hiposekrecijski tip) (Buckley, 2018). Hiposekrecijski tip manje je učestalosti, a najčešće je posljedica starenja i smanjenja funkcije suznih žlijezda. Također, ovaj tip bolesti može biti posljedica autoimune bolesti Sjögrenovog sindroma, kod kojeg imunski sustav napada suzne i druge egzokrine žlijezde, dijabetesa, nošenja kontaktnih leća, laserskog uklanjanja dioptrije ili se može pojaviti kao nuspojava određenih lijekova, poput antihistaminika, diuretika, dekongestiva, tricikličkih antidepresiva, antipsihotika, oralnih kontraceptiva i beta blokatora (Rouen i White, 2018). Hiperevaporacijski tip najčešće je posljedica disfunkcije Meibomovih žlijezda zbog čega je smanjeno izlučivanje meibuma u lipidni sloj suznog filma, a što uzrokuje pojačano isparavanje vodene komponente suznog filma. Hiperevaporacijski tip također može biti posljedica rozaceje, psorijaze, atopijskog dermatitisa, Parkinsonove bolesti (smanjenog treptanja) i nedostatka vitamina A. Neki pacijenti mogu pokazivati simptome oba tipa bolesti (Rouen i White, 2018). Rizik od obolijevanja značajno je veći nakon pedesete godine života, kod ženskog spola, kod žena u postmenopauzi na hormonskoj nadomjesnoj terapiji te u osoba žute rase. Zbog današnjeg načina života, povećanog gledanja u ekrane i boravka u suhim klimatiziranim prostorima, bolest suhog oka sve je češća (Messmer, 2015).

Bolest suhog oka karakterizira primarno hiperosmolalnost suznog filma. Osmolalnost zdravog suznog filma iznosi oko 302 mOsm/kg, dok kod suhog oka ona iznosi preko 315 mOsm/kg (Jurišić Dukovski, 2021; Bron i sur., 2017). Hiperosmolalnost suznog filma dovodi do pucanja suznog filma i posljedično narušene vidne funkcije, pojačanog trenja i oštećenja rožnice te kronične neurogene upale. Upala uzrokuje apoptozu epitelnih i vrčastih stanica, zbog čega se smanjuje koncentracija mucina i ekspresija transmembranskih mucina. Upala također privlači imunosne stanice koje dodatno luče medijatore upale i aktiviraju se metaloproteinaze koje proteolitički razgrađuju čvrste veze između epitelnih stanica rožnice i spojnice. Simptomi bolesti suhog oka su pečenje i iritacija oka, osjećaj stranog tijela u oku, crvenilo i suzenje oka (Jurišić Dukovski, 2021; Bron i sur., 2017). Postoje alati za procjenu stupnja bolesti, poput indeksa bolesti površine oka (engl. *Ocular Surface Disease Index*, OSDI), standardizirane procjene suhoće oka pacijenta (engl. *Standardized Patient Evaluation of Eye Dryness*, SPEED) i upitnika o suhom oku (engl. *Dry Eye Questionnaire*, DEQ-5) (Rouen i White, 2018).

### 1.1.2. Trenutni terapijski pristup bolesti suhog oka

Liječenje bolesti suhog oka vrlo je složeno te je najprije potrebno identificirati uzrok, tip bolesti i stupanj bolesti. Prva linija liječenja najčešće je primjena bezreceptnih kapi za oko (tzv. umjetnih suza), nefarmakološke mjere te upotreba dodataka prehrani s esencijalnim masnim kiselinama. Nefarmakološke mjere sastoje se od izbjegavanja suhих, klimatiziranih prostora, dugotrajnog gledanja u ekrane, poboljšanja higijene vjeđa i primjene toplih kompresa na oči (Jurišić Dukovski, 2021).

Umjetne suze nadomještaju nedostatak vlastitih suza, ali ne djeluju na uzrok bolesti već služe kao simptomatska terapija. Glavni sastojak umjetnih suza je voda, a kako bi se što dulje zadržale na površini oka, umjetnim suzama dodaju se tvari za povećanje viskoznosti poput karboksimetilceluloze, hidroksipropil metilceluloze, hijaluronske kiseline, dekstrana i galaktomanana. Umjetne suze s većim udjelom tvari za povećanje viskoznosti uzrokuju zamućenje vida, stoga se preporučuje njihovo korištenje pred spavanje. Prije spavanja mogu se koristiti i masti za oko koje će spriječiti isparavanje suza tijekom noći. Umjetne suze bez konzervansa imaju prednost pred konzerviranim umjetnim suzama zbog boljeg sigurnosnog profila; konzervans benzalkonijev klorid dodatno isušuje i oštećuje rožnicu. Umjetne suze mogu sadržavati i osmoprotektante, pomoćne tvari koje uravnotežavaju osmotski tlak, kao što su L-karnitin, glicerol, trehaloza, betain i eritritol. Osmoprotektanti smanjuju oštećenje rožnice, apoptozu stanica i koncentraciju proupalnih citokina te povećavaju broj vrčastih stanica.

Kapi za oko koje sadrže lipide pripremaju se kao emulzije, pri čemu je moguće kontrolirati veličinu kapljica, udio uljne faze te tip lipida. Anionski (polarni) fosfolipidi pokazali su dobru kompatibilnost s površinom oka stabilizirajući lipidni sloj interakcijom s vodenomukoznim slojem (Jones, 2017).

Postoje i liposomski sprejevi koji se primjenjuju na zatvoreno oko (Jurišić Dukovski, 2021).

Kod umjerenog i teškog oblika bolesti često je potrebna farmakoterapija. Farmakoterapija bolesti suhog oka liječi primarno upalnu komponentu bolesti. Zasad su odobreni lijekovi imunomodulatori (ciklosporin A), antagonisti integrina i sekretogizi mucina i/ili vodene komponente suza (Jurišić Dukovski, 2021; Colligris i sur., 2014).

Ciklosporin A je ciklički peptid od 11 aminokiselina koji pokazuje protuupalno i imunomodulatorno djelovanje. Djeluje na način da sprječava aktivaciju T-limfocita i posljedično lučenje proupalnih citokina. Pokazalo se da kapi s ciklosporinom A smanjuju hiperosmolalnost suznog filma, povećavaju izlučivanje suza i povećavaju broj vrčastih stanica spojnice. Ciklosporin A siguran je za dugotrajnu kroničnu primjenu, ali djelovanje kod

oftalmičke primjene nastupa nakon otprilike 3 mjeseca terapije (Jurišić Dukovski, 2021; Agarwal i Rupenthal, 2016). Zbog toga se na početku liječenja u terapiju dodaju topikalni glukokortikoidi (Jurišić Dukovski, 2021).

Topikalni glukokortikoidi mogu se za terapiju bolesti suhog oka, osim uz ciklosporin A, koristiti i samostalno zbog svog protuupalnog djelovanja. Međutim, njihova je primjena ograničena na 2 tjedna jer dulja primjena može izazvati oportunističke infekcije, katarakt ili povišen očni tlak. Loteprednoletabonat je glukokortikoid koji se ističe po svojoj građi zbog koje se hidrolitički razgrađuje na neaktivne metabolite nakon vezanja na receptore te ima manji rizik od razvoja nuspojava (Jurišić Dukovski, 2021). Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) ga je 2020. godine odobrila kao lijek Eysuvis® (Kala Pharmaceuticals, Inc.) te on predstavlja prvi odobreni glukokortikoid za kratkotrajnu topikalnu terapiju bolesti suhog oka ([www.drugs.com](http://www.drugs.com)).

Lifitegrast je antagonist integrina odobren za liječenje bolesti suhog oka. Lifitegrast ima protuupalno djelovanje; kao antagonist integrina sprječava vezanje T-limfocita na endotel kapilara i njihovu migraciju (Jurišić Dukovski, 2021; Sun i sur., 2013).

Topikalni sekretogoci, poput dikvafosola i rebamipida, potiču izlučivanje mucina iz vrčastih stanica i odobreni su lijekovi za bolest suhog oka u Japanu i Južnoj Koreji (Jurišić Dukovski, 2021; Jones i sur., 2017).

Ostale terapijske opcije za liječenje bolesti suhog oka uključuju oralne tetracikline i azitromicin, zbog njihovog protuupalnog i antibakterijskog djelovanja, topikalne nesteroidne antireumatike kod blažih oblika bolesti te oralne parasimpatomimetike (pilocarpin i cevimelin) kod Sjögrenovog sindroma. Istražuje se potencijalna topikalna primjena oligonukleotida male interferirajuće ribonukleinske kiseline (engl. *small interfering ribonucleic acid*, siRNA) kod bolesti suhog oka zbog pokazane sigurnosti i učinkovitosti kod smanjenja boli i hiperemije spojnice (Jurišić Dukovski, 2021).

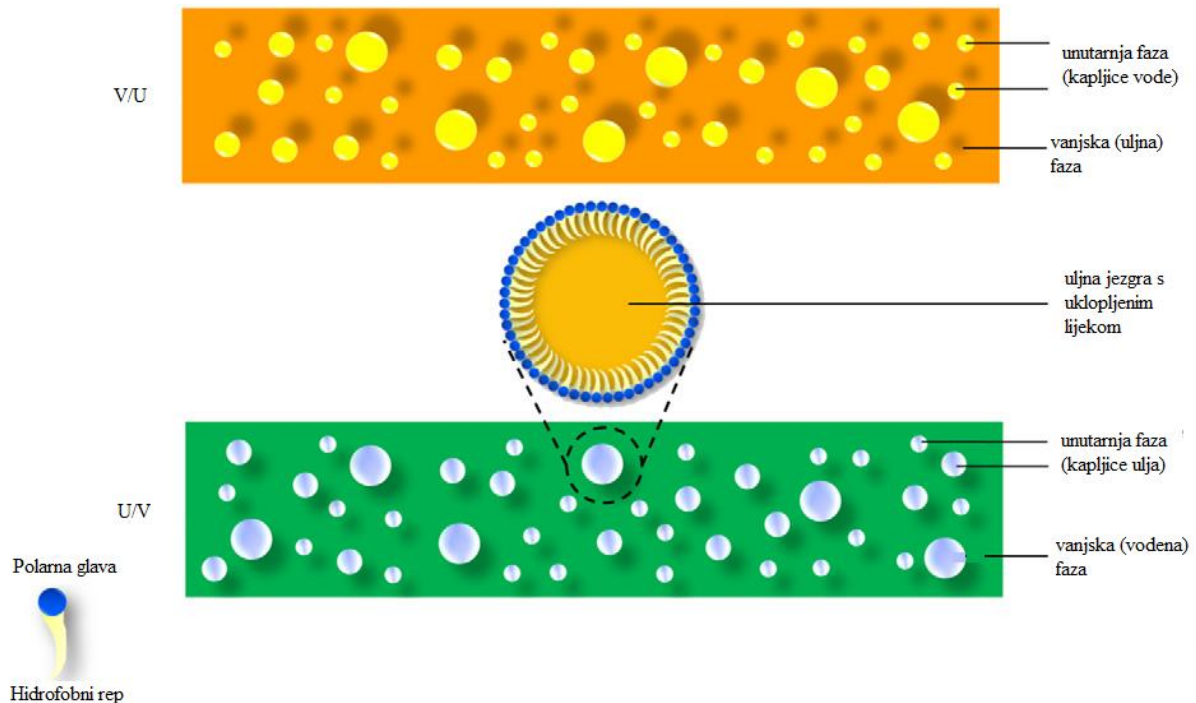
## 1.2. NANOEMULZIJE

### 1.2.1. Nanoemulzije za oftalmičku primjenu

Nanoemulzije su tehnološki oblik koloidnih disperzija dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a kod kojih se veličina kapljica unutarnje faze kreće od 50 do 700 nm (Jurišić Dukovski, 2021). Nanoemulzije su kinetički stabilne, ali termodinamički nestabilne stoga moraju biti stabilizirane površinski aktivnim tvarima (Singh i sur., 2020). U oftalmičkoj primjeni koriste se nanoemulzije tipa ulje u vodi (U/V) zbog pogodnosti uklapanja lipofilnih,



slabo topljivih djelatnih tvari u kapljice unutarnje faze (ulja), zbog mogućnosti miješanja sa suznim filmom nakon primjene te zbog bolje podnošljivosti i smanjene iritacije oka vanjskom vodenom fazom (Jurišić Dukovski, 2021; Castro-Balado i sur., 2020).



Slika 2. Struktura nanoemulzije tipa V/U i U/V (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2017) uz dopuštenje izdavača Elsevier).

Veličina kapljica nanoemulzija za oftalmičku primjenu kreću se od 100 do 300 nm. Interakcijom s lipidnim slojem suznog filma te produljenim oslobađanjem djelatne tvari oftalmičke nanoemulzije postižu dulje zadržavanje djelatne tvari na mjestu primjene te osiguravaju dobru apsorpciju djelatne tvari u dublja tkiva oka preko rožnice (Qamar i sur., 2019). Ograničenja oftalmičke primjene nanoemulzija predstavljaju moguća iritacija oka zbog visoke koncentracije površinski aktivnih tvari, zamućen vid zbog velike viskoznosti, termodinamička nestabilnost tijekom vremena (vrhjenje, flokulacija, Ostwaldovo zrenje i koalescencija) te visoka cijena (Singh i sur., 2020).

### 1.2.2. Sastav nanoemulzija

Nanoemulzije tipa U/V za oftalmičku primjenu sastoje se od uljne (unutarnje) faze, vodene (vanjske) faze i površinski aktivnih tvari. Kod odabira pomoćnih tvari mora se uzeti u obzir

njihova sigurnost primjene na oko, stabilnost formulacije, oslobađanje djelatne tvari nakon primjene te mogućnost pripreme formulacije zadovoljavajućih svojstava (Jurišić Dukovski, 2021).

Odabir uljne faze temelji se na topljivosti djelatne tvari u ulju. Idealna ulja korištena za pripravu nanoemulzija imaju nisku površinsku napetost, malu viskoznost i visoku polarnost (Singh i sur., 2020). Neki od odobrenih ulja i lipida za oftalmičku primjenu su Eutanol G, ricinusovo ulje, oleinska kiselina, kikirikijevo ulje, sojino ulje, fosfolipidi, isopropil miristat i drugi (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Optimalni udio uljne faze za oftalmičku primjenu iznosi 5-10 % (*m/m*) kako bi ukupna viskoznost formulacije bila između 2 i 3 mPas i kako ne bi došlo do zamućenja vida nakon primjene nanoemulzije. Također, važno je uzeti u obzir kompatibilnost uljne faze s ostalim pomoćnim tvarima u formulaciji (Tamilvanan i Benita, 2004).

Površinski aktivne tvari (PAT), tj. surfaktanti, amfifilne su strukture te smanjuju međupovršinsku napetost na granici faza ulje/voda i time stabiliziraju nanoemulziju, omogućavaju raspršivanje disperzne faze u kapljice male veličine, povećavaju moćenje suznog filma interakcijom sa slojem mucina te povećavaju kornealnu permeaciju. Razlikujemo četiri vrste PAT: 1) zwitter-ionske, 2) neionske, 3) anionske i 4) kationske PAT (Singh i sur., 2020). Neionske PAT, poput tiloksapola, polisorbata, makrogolglicerol ricinoleata i makrogol hidroksistearata, prikladne su za oftalmičku primjenu zbog malog iritacijskog potencijala. One formiraju hidratizirani sloj oko hidrofobnih kapljica, a stabilizirane su vodikovim i dipol-dipol vezama te steričkom stabilizacijom (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Konačni udio PAT mora biti kompromis između toksičnosti i stabilnosti formulacije (Jurišić Dukovski, 2021). Također, važan čimbenik koji treba razmotriti pri razvoju nanoemulzija jest kompatibilnost duljine lanaca PAT i duljine lanaca ulja u uljnoj fazi (Singh i sur., 2020). Neki od PAT, osim svoje površinske aktivnosti, posjeduju i protuupalno djelovanje – npr. tiloksapol inhibira aktivaciju jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) u monocitima, inhibira proizvodnju proupalnih citokina te inhibira reakciju makrofaga na endotoksine (Daull i sur., 2020). Na taj način PAT mogu djelovati sinergistički s djelatnom tvari u cilju smanjenja upale koja je prisutna kod bolesti suhog oka.

Nanoemulzije mogu sadržavati i neke druge pomoćne tvari, kao što su tvari za povećanje viskoznosti, kosurfaktanti, kationske tvari, konzervansi, puferi i tvari za izotonizaciju.

Tvari za povećanje viskoznosti produljuju vrijeme zadržavanja nanoemulzije na površini oka, povećavaju debljinu suznog filma i dodatno štite površinu oka. Također, povećanjem viskoznosti vanjske faze dolazi do dodatnog smanjenja veličine kapljica nanoemulzije (Jurišić

Dukovski, 2021). U tu svrhu najčešće se koriste hidroksimetilceluloza, kabroksimetilceluloza, polivinilni alkohol, ksantanska guma, hijaluronska kiselina, polietilenglikol, hidroksipropilmetilceluloza i polivinilpirolidon (Castro-Balado, 2020). Za povećanje viskoznosti koriste se i *in-situ* gelirajuće tvari koje omogućuju da je formulacija u tekućem obliku, a da pri primjeni zbog promjene temperature, pH ili zbog prisutnosti iona u suznoj tekućini formulacija prelazi u gel stanje i povećava se viskoznost. Takve su tvari, na primjer, poloksameri, ksiloglukan, kitozan, karbomer i ksantanska guma (Singh i sur., 2020).

Kosurfaktanti djeluju sinergistički sa PAT u vidu smanjenja međupovršinske napetosti te se njihovom primjenom smanjuje potrebna koncentracija PAT. Kao kosurfaktanti za oftalmičku primjenu mogu se koristiti propilenglikol, glicerol, polietilenglikol, Cremophor EL, Cremophor RH40 i Transcutol-P (Singh i sur., 2020).

Kationske tvari oblažu kapljice nanoemulzije dajući im pozitivan naboj i time stvaraju elektrostatsko odbijanje između kapljica što rezultira stabiliziranjem nanoemulzije. Također, poznato je da je površina oka negativno nabijena zbog sloja mucina. Kationske tvari uzrokuju interakciju pozitivno nabijenih kapljica nanoemulzije s negativno nabijenom površinom oka i uzrokuju produljeno zadržavanje nanoemulzije na mjestu primjene. U tu svrhu koriste se primjerice kationski kvarterni amonijevi spojevi (benzalkonij klorid, cetalkonij klorid, cetrimid), kationski lipidi (npr. stearylamin) i kationski polimeri (npr. kitozan) (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020).

Konzervansi sprječavaju kontaminaciju formulacije mikroorganizmima, a za oftalmičku primjenu najčešće se koristi benzalkonijev klorid (BAK). BAK, kao smjesa kvarternih amonijevih spojeva, narušava integritet negativno nabijene membrane mikroorganizama i uzrokuje njihovu smrt. Međutim, djeluje neselektivno pa tako djeluje i na membrane epitelnih stanica rožnice i spojnice i na membrane vrčastih stanica oka. Zbog toga se kod terapije bolesti suhog oka dugotrajna i kronična primjena pripravaka s benzalkonijevim kloridom ne preporuča, štoviše, preporučuje se izbjegavanje i ostalih konzervansa (Jurišić Dukovski, 2021). Poželjno je koristiti kapi za oko u sterilnim jednodoznim spremnicima kako bi se izbjegla potencijalna kontaminacija zbog opetovanog korištenja višedoznih spremnika (Tamilvanan i Benita, 2004). Puferi su smjese slabih kiselina i njihovih soli ili slabih baza i njihovih soli te služe za održavanje vrijednosti pH. U oftalmičkoj primjeni puferi nisu obavezan sastojak formulacija zbog puferskog kapaciteta suza koje, nakon primjene kapi za oko, brzo vraćaju pH na fiziološke vrijednosti (Jurišić Dukovski, 2021).

Osmolalnost nanoemulzija za oftalmičku primjenu mora odgovarati fiziološkoj osmolalnosti suznog filma ( $300,5 \pm 7,2$  mOsm/kg). U tu svrhu najčešće se koristi glicerol u koncentraciji

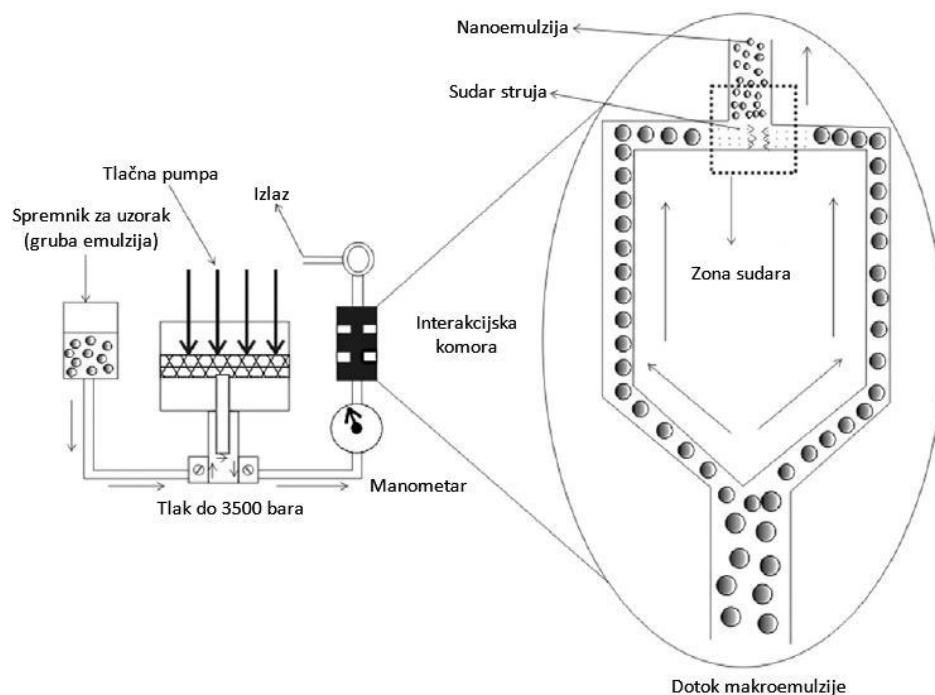
2,25 – 2,5 % (*m/m*), a preporučena je primjena i sorbitola ili ksilitola (Castro-Balado, 2020; Tamilvanan i Benita, 2004).

### 1.2.3. Metode priprave nanoemulzija

Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi stoga je za njihovu pripravu potrebno uložiti energiju. Metode priprave nanoemulzija dijele se na niskoenergetske i visokoenergetske metode. Zajednički postupak uključuje disperziju lipofilnog lijeka direktno u ulju ili uz pomoć organskog otapala te otapanje hidrofilnih komponenti u vodi. Koji tip nanoemulzije će nastati ovisi o volumnom udjelu pojedine faze (ona faza koja prevladava bit će vanjska) te o tipu PAT koja se koristi. Tako će, ako koristimo PAT topljivu u vodi, nastati nanoemulzija tipa U/V, i obrnuto (Singh i sur., 2017). Prije bilo koje metode potrebno je pomiješati pripremljenu uljnu i vodenu fazu na miješalici pri velikim brzinama okretaja (Jurišić Dukovski, 2021).

Visokoenergetske metode koriste mehaničku silu za smanjenje veličine kapljica. U tu svrhu koriste se ultrasonikatori, mikrofluidizatori i visokotlačni homogenizatori (Singh i sur., 2017). Primijenjena količina smicanja u direktnoj je vezi sa smanjenjem veličine kapljica nanoemulzija jer dovodi do deformacije i istežanja uljnih kapljica, zbog čega se one dijele na manje kapljice (Jurišić Dukovski, 2021). Upotreba PAT smanjuje potrebnu količinu smicanja jer PAT smanjuju površinsku napetost na granici faza i stabiliziraju novonastale kapljice.

Smanjenje veličine kapljica pomoću mikrofluidizatora postiže se zbog istovremenog smicanja, udara, trenja, intenzivne turbulencije i kavitacije. Gruba emulzija koju smo prethodno pripremili propušta se pod visokim tlakom kroz uske mikrokanaliće interakcijske komore. U njoj se sudaraju dvije struje formulacija i dolazi do smanjenja veličine kapljica. Obično se emulzija mora više puta propustiti kroz mikrofluidizator kako bi se dobila nanoemulzija željenih svojstava. Pri radu mikrofluidizatora nastaje višak energije koji se oslobađa kao toplina pa je sustav potrebno hladiti (Singh i sur., 2017).



Slika 3. Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno prema Singh i sur., (2017) uz dopuštenje izdavača Elsevier).

Ultrasonikatori koriste ultrazvučnu sondu kojom smanjuju veličinu kapljica. Što je dulje vrijeme soniciranja i što je veća uložena snaga, veće je smanjenje kapljica. Ultrasonikacija koristi manje energije od ostalih visokoenergetskih metoda, ali je prisutna mogućnost kontaminacije formulacije uranjanjem sonde (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017; Solans i sur., 2005).

Visokotlačni homogenizatori rade na principu koloidnog mlina te koriste hidraulično smicanje za smanjenje veličine kapljica. Gruba emulzija propušta se kroz uzak otvor i dolazi u prostor između statora i rotora koji se vrlo brzo okreće. Konačnu veličinu kapljica nanoemulzije određuje širina otvora. Formulaciju je, također, potrebno propustiti kroz visokotlačni homogenizator više puta (Jurišić Dukovski, 2021; Gupta i sur., 2016; Solans i sur., 2005).

Niskoenergetske metode pripreme nanoemulzija ne zahtijevaju vanjski izvor energije jer se koristi kemijska energija unutar samog sustava. Ovakve metode omogućuju nastanak nanoemulzija manjih prosječnih veličina kapljica, ali je izbor tvari za pripremu nanoemulzija značajno sužen. Neke od niskoenergetskih metoda su metoda spontanog emulgiranja i metoda inverzije faza (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017; Solans i sur., 2005)

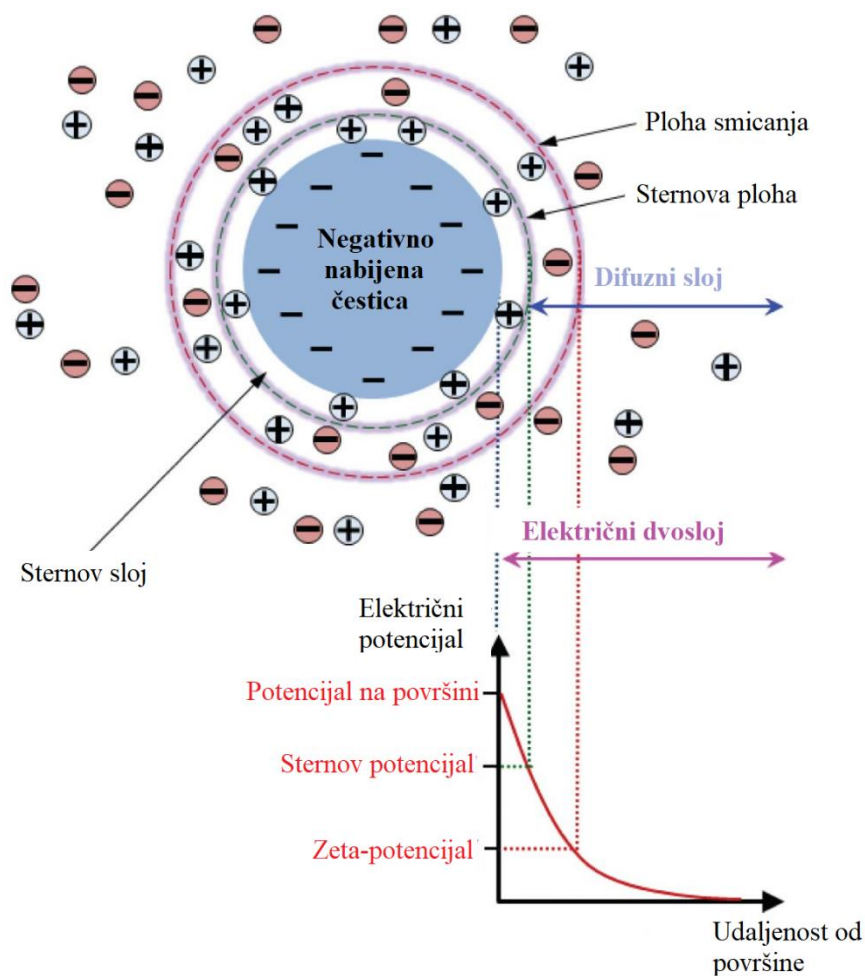
#### 1.2.4. Svojstva nanoemulzija

Fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija utječu na stabilnost, biokompatibilnost i brzinu oslobađanja djelatne tvari. Kako bi liječenje bolesti suhog oka bilo sigurno i učinkovito, propisana su svojstva kakva nanoemulzija mora imati. U tu svrhu određuju se veličina kapljica unutarnje faze, raspodjela veličine kapljica ili indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI), zeta-potencijal, viskoznost, pH, osmolalnost, površinska napetost i raspodjela djelatne tvari unutar formulacije.

Veličina kapljica i raspodjela veličine kapljica određuju se najčešće tehnikom dinamičkog raspršivanja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), tj. fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) (Singh i sur., 2020). DLS tehnika mjeri prosječnu veličinu kapljica pomoću mjerenja Brownovog gibanja čestica tj. fluktuacije u intenzitetu raspršivanja svjetlosti. Uzorak se obasjava laserom pri čemu se svjetlost raspršuje na kapljicama ulja pod različitim kutevima, ovisno o veličini kapljice. Manje kapljice imaju veću brzinu Brownovog gibanja, stoga daju veće fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti. Indeks polidisperznosti predstavlja mjeru rasapa veličine kapljica nanoemulzije oko prosječne vrijednosti (Jurišić Dukovski, 2021). Nanoemulzije se smatraju monodisperznima ako im je PDI vrijednosti manja od 0,2 (Singh i sur., 2017). Veličina kapljica može se mjeriti i tehnikom nuklearne magnetske rezonance (2D DOSY-NMR), laserskom difrakcijom, analizom praćenja nanočestica (engl. *Nanoparticle tracking analysis*, NTA) te kriogenom transmisivskom elektronskom mikroskopijom (engl. *Cryogenic transmission electron microscopy*, Cryo-TEM) (Singh i sur., 2020; Petrochenko i sur., 2018).

Dokazano je da na veličinu kapljica unutarnje faze utječu vrsta i udio korištenog ulja, površinska napetost ulja, količina PAT te viskoznost vanjske i unutarnje faze. Veličina kapljica nanoemulzije biti će manja što je veći udio PAT, što je veća viskoznost vanjske faze i manja viskoznost unutarnje faze te što je manja površinska napetost ulja. Također, smanjenje veličine kapljica postiže se i propuštanjem formulacije kroz više ciklusa u mikrofluidizatoru te mikrofluidizacija pri višem tlaku (Jurišić Dukovski i sur., 2019; Sosnowska i sur., 2017; Gupta i sur., 2016). Smanjenjem veličine kapljica povećava se brzina oslobađanja djelatne tvari na mjestu primjene zbog veće ukupne površine na granici faza (Singh i sur., 2020). Veličina kapljica važna je i za stabilizaciju nanoemulzije - kad je polumjer kapljica manji od 90 nm, Brownova gibanja nadvladavaju gravitacijsku silu i formulacija je stabilizirana (Sosnowska i sur., 2017).

Zeta-potencijal predstavlja naboj na površini kapljica tj., potencijal na plohi smicanja električnog dvosloja kapljice. Ovisi o prirodi disperzanta i koncentraciji soli u disperzantu, a utječe na stabilnost formulacije te njenu interakciju s negativno nabijenom površinom oka i na vrijeme zadržavanja na mjestu primjene (Jurišić Dukovski, 2021; Varenne i sur., 2019). Zeta-potencijal mjeri se preko elektroforetske pokretljivosti, koristeći tehniku elektroforetskog raspršivanja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS). Kapljice nanoemulzije se u električnom polju kreću prema elektrodi suprotnog naboja i pritom se obasjavaju laserom. ELS mjeri razliku u frekvenciji između raspršene svjetlosti i originalne laserske zrake koja je proporcionalna brzini kapljica. Što su vrijednosti zeta-potencijala više, to je veće odbijanje između kapljica i time se povećava stabilnost (Jurišić Dukovski, 2021; Varenne i sur., 2019). Optimalnim zeta-potencijalom kationskih nanoemulzija za oftalmičku primjenu smatraju se vrijednosti od 20 mV do 40 mV (Singh i sur., 2020).



Slika 4. Shematski prikaz električnog dvosloja (preuzeto i prilagođeno prema Park i Seo, (2011), uz dopuštenje izdavača Elsevier).

Viskoznost nanoemulzije utječe na vrijeme zadržavanja formulacije na površini oka, na veličinu kapljica te na ugodnost primjene. Što je viskoznost veća, smanjena je brzina eliminacije s površine oka i povećana je bioraspoloživost djelatne tvari. Prevelika viskoznost, međutim, može usporiti apsorpciju djelatne tvari te izazvati zamućenje vida. Također, formulacije niže viskoznosti preciznije se doziraju (Jurišić Dukovski i sur., 2019). Idealna viskoznost nanoemulzija za oftalmičku primjenu iznosi između 2 i 3 mPas, a idealan omjer viskoznosti unutarnje i viskoznosti vanjske faze iznosi između 0,05 i 5. Viskoznost nanoemulzije može se povećati povećanjem udjela uljne faze i dodatkom gelirajućih agenasa (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017; Tamilvanan i Benita, 2004).

pH vrijednost nanoemulzije utječe na ugodnost primjene te stabilnost i topljivost djelatnih i pomoćnih tvari. Kako bi se smanjio iritacijski potencijal, poželjno je da pH vrijednost formulacije bude što sličnija pH vrijednosti suznog filma koja u prosjeku iznosi između 6,8 i 8,2. No, formulacije nižeg pH podnose se dobro zbog puferskog kapaciteta suza (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017).

Ugodnost primjene na oko ovisi i o osmolalnosti formulacije. Sve kapi za oko moraju biti izotonizirane da odgovaraju osmolalnosti suznog filma koja iznosi između 270 i 315 mOsm/kg. Oko tolerira formulacije osmolalnosti 100 – 454 mOsm/kg, ali je za liječenje bolesti suhog oka važno da je osmolalnost bude što bliža fiziološkoj osmolalnosti suznog filma (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Za izotonizaciju se često koriste glicerol, sorbitol, manitol, dekstroza i propilenglikol (Singh i sur., 2020).

Površinska napetost formulacije utječe na njezino zadržavanje na mjestu primjene, širenje po površini oka, miješanje sa suznim filmom te na ugodnost primjene. Također, što je volumen primijenjene kapi manji, manja je i površinska napetost na granici faza. Pokazalo se da je idealan volumen primijenjene kapi za liječenje bolesti suhog oka između 5 i 15  $\mu\text{L}$  (Singh i sur., 2020). Površinska napetost suznog filma iznosi 40,9–46,3  $\text{mNm}^{-1}$ , a kod suhog oka površinska je napetost veća (47,4–51,8  $\text{mNm}^{-1}$ ) te je suzni film destabiliziran. Primjenom formulacije niže površinske napetosti povećava se stabilnost suznog filma, ali se ubrzava i eliminacija pripravka s površine oka. Također, pokazalo se da je primjena kapi za oko površinske napetosti niže od 35  $\text{mNm}^{-1}$  bolna. Stoga, idealna površinska napetost formulacije kreće se između 40 i 50  $\text{mNm}^{-1}$  (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Za snižavanje površinske napetosti koriste se PAT.

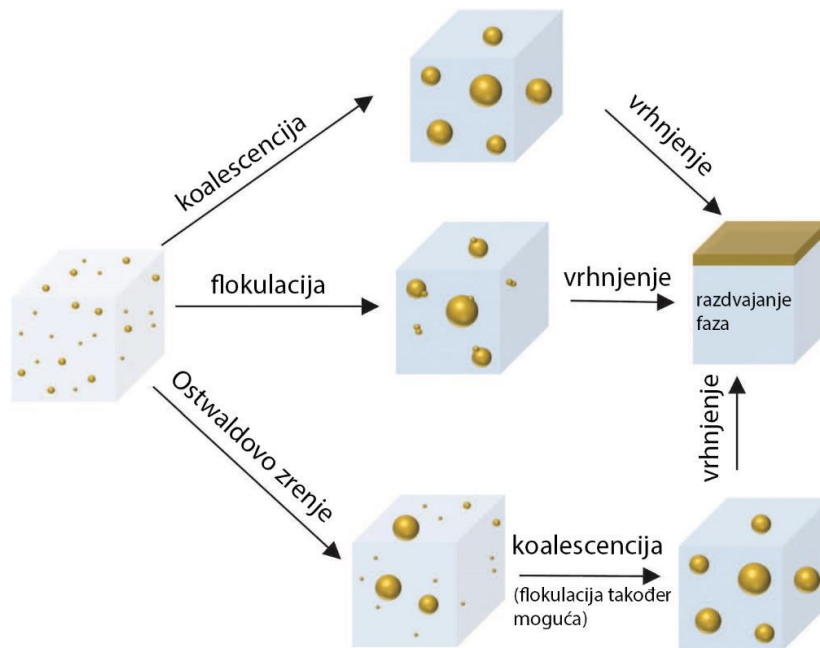
Nanoemulzije tipa U/V pokazale su se vrlo učinkovite kod primjene lipofilnih, slabo topljivih lijekova. Takve su djelatne tvari uklopljene u uljnu fazu ili na granici faza, ovisno o lipofilnosti, molekulskoj masi i strukturi djelatne tvari te ovisno o načinu pripreme nanoemulzije. Raspodjelu



i učinkovitost uklapanja djelatne tvari moguće je mjeriti koristeći ultrafiltraciju, ultracentrifugiranje, gel filtraciju, mikrodijalizu ili diferencijalnu pretražnu kalorimetriju (Singh i sur., 2020; Jurišić Dukovski i sur., 2019).

#### 1.2.5. Stabilnost nanoemulzija

Nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi, što znači da je za njihovu pripravu potrebno uložiti energiju. Zbog uložene energije nanoemulzije sadrže vrlo sitne kapljice unutarnje faze. Zbog nanometarskih veličina kapljica, Brownova gibanja nadvladavaju gravitacijsku silu te su zbog toga nanoemulzije kinetički stabilne mjesecima ili čak godinama, a mehanizmi destabilizacije su znatno usporeni, za razliku od makroemulzija (Jurišić Dukovski, 2021; Solans i sur., 2005). Najznačajniji mehanizam destabilizacije nanoemulzija je Ostwaldovo zrenje kod kojeg dolazi do rasta većih kapljica na uštrb manjih kapljica zbog razlike u kemijskom potencijalu kapljica različitih veličina. Moguće je i reverzibilno udruživanje kapljica unutarnje faze u veće nakupine, što nazivamo flokulacijom. Tijekom vremena, zbog razlike u gustoći između unutarnje i vanjske faze, moguća je pojava vrhnjenja – nakupljanja kapljica unutarnje faze na površini nanoemulzije. Vrhnenjem se smanjuje udaljenost između kapljica pa može doći do ireverzibilnog spajanja kapljica – koalescencije. Navedeni mehanizmi destabilizacije mogu se usporiti čuvanjem pripravka na nižim temperaturama, korištenjem ulja vrlo niske topljivosti u vodi, osiguravanjem uske raspodjele veličine kapljica pri pripremi nanoemulzija te korištenjem PAT koje će ili stvoriti debeo sloj oko kapljica i uzrokovati međusobno steričko odbijanje ili stvoriti naboj na kapljicama uzrokujući međusobno elektrostatsko odbijanje (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017). Manja veličina kapljica unutarnje faze i veća apsolutna vrijednost zeta-potencijala idu u prilog većoj stabilnosti formulacije. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija vrši se pohranom u realnom vremenu pri temperaturi 4-25°C tijekom nekoliko mjeseci pri čemu se mjere fizičko-kemijska svojstva i izgled formulacije. Formulacije se, također, mogu podvrgnuti ciklusima zagrijavanja i hlađenja, smrzavanja i odmrzavanja, ciklusima centrifugiranja te pohrani pri povišenim temperaturama nakon čega se ispituju izgled i svojstva (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020; Singh i sur., 2017).

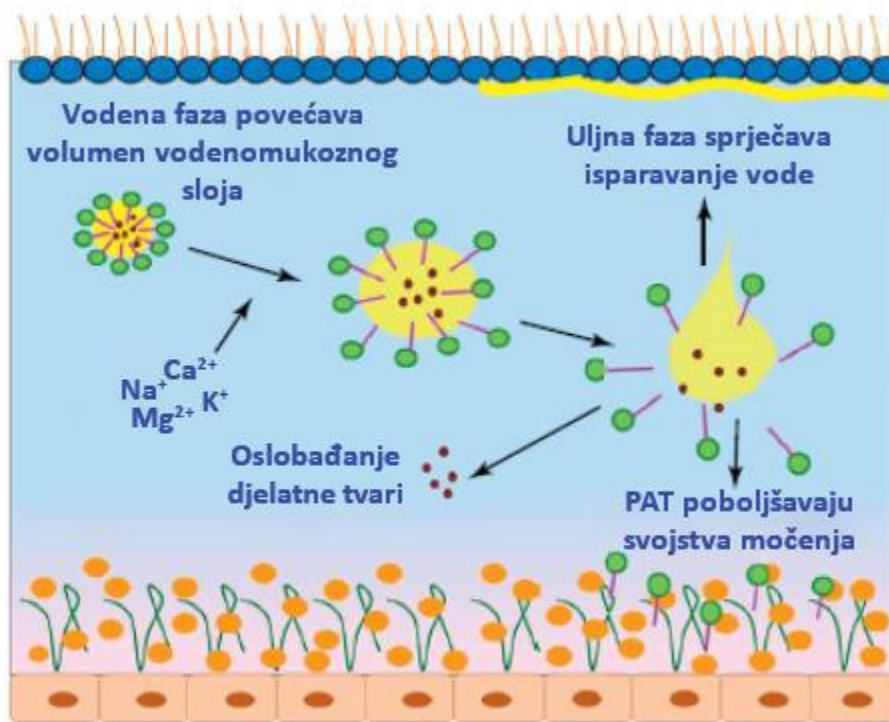


Slika 5. Shematski prikaz mehanizama destabilizacije nanoemulzija (preuzeto i prilagođeno iz Gupta i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača).

### 1.2.6. Nanoemulzije u kontaktu s okom

Nanoemulzije tipa U/V vrlo su pogodne za uklapanje lipofilnih i osjetljivih tvari vrlo male topljivosti u vodi koje u običnim otopinama imaju vrlo nisku oftalmičku bioraspoloživost (Singh i sur., 2017). Takve djelatne tvari mogu biti uklopljene u uljnu fazu, na granici faza, mogu se naći dijelom i u vodenoj fazi te u micelama koje tvore PAT. Raspodjela djelatne tvari unutar nanoemulzije utječe na raspodjelu djelatne tvari u tkiva oka. Nakon primjene na površinu oka, formulacija se razrjeđuje suzama te dolazi do stapanja vodene faze nanoemulzije s vodenomukoznim slojem suznog filma i povećanja njegovog volumena. Uljna se faza stapa s lipidnim slojem suznog filma, povećava se debljina suznog filma, ostvaruje se produljeno zadržavanje lijeka na mjestu primjene i smanjuje se isparavanje vodene komponente. PAT na granici između uljne i vodene faze formulacije ulaze u interakciju s lipidnim slojem suznog filma i s mucinima te poboljšavaju svojstva močenja površine oka i stabiliziraju suzni film (Jurišić Dukovski, 2021). Neke neionske PAT, također, imaju sposobnost inhibicije P-glikoproteina na stanicama epitela rožnice i time poboljšavaju apsorpciju i penetraciju djelatne tvari (Gan i sur., 2013). Djelatna se tvar nakon primjene formulacije na oko oslobađa iz kapljica uljne faze i apsorbira se preko stanične membrane u stanice površine oka (Tamilvanan i Benita, 2004). Neoslobodena frakcija djelatne tvari zaostaje u uljnoj fazi u donjoj vjeđi i tamo stvara depo (Jurišić Dukovski, 2021). Nanoemulzije, kao nosači lijeka, osim što poboljšavaju

topljivost djelatne tvari, smanjuju i njezinu potencijalnu toksičnost za oko (Castro-Balado i sur., 2020). Pažljivim odabirom sastavnica formulacije koje će djelovati na više meta u liječenju bolesti suhog oka, moguće je pripremiti nanoemulzije koje će povećati učinkovitost uklapanja i vrijeme zadržavanja djelatne tvari na površini oka, apsorpciju djelatne tvari u površinske epitelne stanice te time poboljšati terapijski učinak lijeka (Singh i sur., 2017).



Slika 6. Interakcija nanoemulzije sa suznim filmom nakon primjene (preuzeto i prilagođeno iz Gan i sur., (2013) uz dopuštenje izdavača Elsevier).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Terapija bolesti suhog oka često nailazi na mnoge izazove – malen volumen formulacije koji stane u donju vjeđu, brzo uklanjanje formulacije s površine oka zbog suženja, treptanja i nazolakrimalne drenaže, učestalo doziranje, zamućenje vida kod primjene, neučinkovito uklapanje lijekova slabo topljivih u vodi i mnogi drugi (Jurišić Dukovski, 2021; Qamar i sur., 2019). Nanoemulzije kao tehnološki farmaceutski oblik za oftalmičku primjenu lipofilnih lijekova sve se više istražuju zadnjih 30-ak godina. Tako je 2002. godine FDA odobrila prvu anionsku nanoemulziju s ciklosporinom A za terapiju bolesti suhog oka, Restasis™ (Allergan, Irvine, USA). Nanoemulzije tipa U/V za oftalmičku primjenu korisne su u liječenju bolesti suhog oka čak i ako ne sadrže djelatnu tvar (npr. protuupalni lijek) kao primjerice Cationorm® (Santen, Novagali Pharma). Pomoćne tvari korištene u izradi nanoemulzija djeluju povoljno na smanjenje simptoma bolesti suhog oka. PAT povećavaju moćenje suznog filma, stabiliziraju suzni film poboljšavajući interakciju lipidnog i vodenomukoznog sloja te neke vrste djeluju i protuupalno, a lipidi uljne faze povećavaju debljinu lipidnog sloja suznog filma i smanjuju isparavanje vodenomukoznog sloja (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Kvalitetu, stabilnost, sigurnost primjene nanoemulzija te raspoloživost uklopljene djelatne tvari određuju fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija, poput veličine kapljica unutarnje faze, indeksa polidisperznosti i zeta-potencijala (Varenne i sur., 2019). Osim fizičko-kemijskih svojstva, na kliničku učinkovitost nanoemulzije uvelike utječu fiziološka svojstva površine oka te interakcija nanoemulzije s istom (Daull i sur., 2020). Iako su nanoemulzije u kliničkoj upotrebi više od 20 godina, saznanja o promjeni njihovih fizičko-kemijskih svojstava nakon primjene su vrlo oskudna, a ne postoje ni *in vitro* metode koje predviđaju stabilnost nanoemulzija na površini oka.

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost oftalmičke nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza. Kao uljna faza odabrano je sojino ulje zbog njegove vrlo niske topljivosti u vodi što povećava stabilnost formulacije (Macoon i Chauhan, 2020). Od neionskih PAT korišteni su polisorbitat 80, tiloksapol, makrogol 15 hidrosistearat (Kolliphor® HS 15) i makrogolglicerol ricinoleat 35 (Kolliphor® EL). Kao metoda pripreme nanoemulzija odabrana je metoda mikrofluidizacije. Pripravljenim nanoemulzijama određena je veličina kapljica, raspodjela veličine kapljica te zeta-potencijal.

Specifični ciljevi diplomskog rada su:

- Pripraviti jednostavne U/V nanoemulzije stabilizirane neionskom PAT;

- Odrediti utjecaj razrjeđenja vodom ili vanjskom fazom nanoemulzije na veličinu i raspodjelu veličina te zeta-potencijal kapljica nanoemulzije;
- Odrediti utjecaj razrjeđenja umjetnom suznom tekućinom na veličinu i raspodjelu veličina te zeta-potencijal kapljica nanoemulzije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Za pripravu U/V nanoemulzija korišten je makrogolglicerol ricinoleat 35 (Kolliphor® EL, BASF, Ludwigshafen, Njemačka; KEL), polisorbitat 80 (Polysorbitum 80, Fagron Hrvatska d.o.o., D. Zelina, Hrvatska; P80), makrogol 15 hidroksistearat (Kolliphor® HS 15, BASF, Ludwigshafen, Njemačka; KHS), tiloksapol (Tyloxapol, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka; TX), glicerol (Glycerolum, Fagron Hrvatska d.o.o., D. Zelina, Hrvatska), sojino ulje (Soybean oil, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) te redestilirana voda kao vanjska faza. Sve korištene PAT odobrene su od FDA za oftalmičku primjenu (*FDA Inactive Ingredients Database*: <https://www.fda.gov/>).

Za pripravu umjetne suzne tekućine (engl. *Artificial Tear Solution*, ATS) korišten je natrijev klorid (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalijev klorid (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), natrijev citrat dihidrat (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska), D(+)-glukoza bezvodna (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), urea (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalcijev klorid bezvodni (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), natrijev karbonat bezvodni (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalijev hidrogenkarbonat (BDH PROLABO, Ujedinjena Kraljevina), natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Fluka Chemie AG, Švicarska) i klorovodična kiselina (37 %=10 M) (Panreac Química S.A.U., Španjolska).

#### 3.2. Metode

##### 3.2.1. Priprava nanoemulzija

Priprava nanoemulzija sastojala se od nekoliko koraka. Pripravljene su formulacije s 4 različite neionske PAT: Kolliphor® EL (KEL), polisorbitat 80 (P80), Kolliphor® HS 15 (KHS) i Tyloxapol (TX). Udio PAT iznosio je 1 % (*m/m*), glicerola 2,5 % (*m/m*) te sojinog ulja kao uljne faze 5 % (*m/m*) (Jurišić Dukovski, 2021). Sastav ispitivanih nanoemulzija prikazan je u Tablici 1. Svaka je formulacija rađena u duplikatu. PAT su izvagane i otopljene u vodi na magnetskoj mješalici 2mag MIX 15 eco (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) pri 500 rpm tijekom 10 minuta, potom je dodan glicerol za izotonizaciju, ponovo se kratko promiješalo te je na kraju dodana uljna faza. Emulzija je miješana na magnetskoj mješalici pri 800 rpm tijekom 15 minuta. Uzorci su zatim miješani s visokoturažnom mješalicom ULTRA TURRAX® T18 (IKA®-Werke GmbH & Co, Njemačka) pri 1500 rpm tijekom 3 minute nakon čega su poprimili mlječni izgled. Zadnji korak pripreve bila je

mikrofluidizacija uzoraka na mikrofluidizatoru Model LM20 Microfluidizer® (Microfluidics, Newton MA, SAD) kroz 10 ciklusa pri 1000 bara, čime smo dobili homogene nanoemulzije.

Tablica 1. Sastav ispitivanih nanoemulzija

Formulacija	Sastavnice (% , <i>m/m</i> )					
	Sojino ulje	Glicerol	Kolliphor® EL	Polisorbat 80	Tyloxapol	Kolliphor® HS 15
KEL – 1	5	2,5	1	-	-	
KEL – 2						
P80 – 1			-	1	-	-
P80 – 2						
TX – 1			-	-	1	-
TX – 2						
KHS - 1			-	-	-	1
KHS – 2						

### 3.2.2. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti (PDI) nanoemulzija

Uzorci su najprije razrjeđivani s redestiliranom vodom, prethodno profiltriranom kroz filtar CHROMAFIL® Xtra PES-45/25, veličina pora 0,45 µm (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Svaki je uzorak razrijeđen 10, 100 i 1000 puta. Za mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti korišten je Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, UK) koji u tu svrhu koristi tehniku dinamičkog raspršivanja svjetla (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS). Mjerenja su provođena na temperaturi od 25°C i pri kutu od 174,7°, u jednokratnim kivetama od polistirena (10x10x45 mm, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Njemačka). DLS mjeri Brownovo gibanje čestica (kapljica ulja u nanoemulziji), tj. fluktuacije u intenzitetu raspršivanja svjetlosti, temeljeći se na Stokes-Einstein jednadžbi. Intenzitet raspršivanja svjetlosti, prema tome, ovisi o promjeru kapljice, viskoznosti disperzanta, temperaturi te indeksu loma (Petrochenko i sur., 2018). Uzorak se obasjava laserom pri čemu se svjetlost raspršuje na kapljicama ulja pod različitim kutevima, ovisno o veličini kapljice. Manje kapljice imaju veću brzinu Brownovog gibanja, stoga daju veće fluktuacije intenziteta raspršene svjetlosti (Jurišić Dukovski, 2021). Uređaj mjeri aritmetičku sredinu veličine kapljica (engl. *Z-Average*) nakon tri ciklusa po 10 mjerenja te indeks polidisperznosti (engl.

*Polidispersity index*, PDI) kao mjeru rasapa veličina kapljica unutarnje faze nanoemulzije oko prosječne vrijednosti. Razrjeđivanjem uzoraka smanjuju se moguće interferencije pomoćnih tvari te se poboljšava dosljednost i reproducibilnost rezultata (Petrochenko i sur., 2018).

### 3.2.3. Mjerenje zeta-potencijala nanoemulzija

Zeta-potencijal uvelike ovisi o prirodi i viskoznosti disperzanta, stoga su uzorci prije mjerenja razrijeđeni s 2,5 %-tnom otopinom glicerola 10, 100 i 1000 puta. Zeta-potencijal uzoraka mjeren je također na Zetasizer Ultra uređaju koristeći tehniku elektroforetskog raspršivanja svjetlosti (ELS). Zeta-potencijal računa se iz elektroforetske pokretljivosti kapljica preko Henry-jeve jednadžbe. Kapljice, koje se u električnom polju kreću prema elektrodama, obasjavaju se laserom te se mjeri razlika u frekvenciji između raspršene svjetlosti i originalne laserske zrake. Ta je razlika u frekvenciji proporcionalna brzini kapljica. Kapljice koje imaju veću apsolutnu vrijednost naboja kreću se brže prema elektrodi suprotnog naboja (Jurišić Dukovski, 2021). Uzorci su mjereni u triplikatu.

### 3.2.4. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija u uvjetima simulirane izmjene suza

Umjetna suzna tekućina (engl. *artificial tear solution*, ATS) pripravljena je otapanjem 1,315 g natrijevog klorida, 0,298 g kalijevog klorida, 0,110 g natrijevog citrata dihidrata, 0,009 g bezvodne D(+)-glukoze, 0,018 g ureje, 0,014 g bezvodnog kalcijevog klorida, 0,318 g bezvodnog natrijevog karbonata, 0,075 g kalijevog hidrogenkarbonata, 1,068 g natrijevog hidrogenfosfata dihidrata i 0,65 mL klorovodične kiseline (37 % = 10 M) u 250 mL redestilirane vode (Lorentz, 2011). Sastav umjetne suzne tekućine prikazan je u Tablici 2. ATS-u je pomoću pH-metra S47 SevenMulti™ (Mettler Toledo) izmjeren pH od 6,6, nakon čega je premješten u tresilicu Environmental Shaker – Incubator ES-20/60 (Biosan, Latvia) gdje je zagrijan na 34°C. S obzirom da omjer volumena kapi za oko i prosječnog volumena suznog filma iznosi 25:7, uzorak nanoemulzije i ATS pomiješani su u volumnom omjeru 25:7 te je smjesa ukupnog volumena od 6,25 mL termostatirana tijekom cijelog pokusa na 34°C (Gugleva, 2020). Tijekom 40 minuta od miješanja uzorka s ATS-om, svake je minute uzorkovan 1 mL smjese i nadomješten s 1 mL ATS-a kako bi se imitirao fiziološki klirens na površini oka koji iznosi 16% u minuti (Pepić, Lovrić i sur., 2014). Uzorcima uzetim nakon 1, 10, 20, 30 i 40 minuta mjerena je veličina kapljica, PDI i zeta-potencijal. Ispitana su dva uzorka nanoemulzije, a mjerenja su rađena u triplikatu.



Tablica 2. Sastav umjetne suzne tekućine

<b>Sastavnica</b>	<b>Koncentracija g/L [mM]</b>
Natrijev klorid	5,26 [90,0]
Kalijev klorid	1,19 [16,0]
Natrijev citrat dihidrat	0,44 [1,5]
Bezvodna glukoza	0,04 [0,2]
Urea	0,07 [1,2]
Kalcijev klorid	0,06 [0,5]
Natrijev karbonat	1,27 [12,0]
Kalijev hidrogenkarbonat	0,30 [3,0]
Natrijev hidrogenfosfat dihidrat	4,27 [24,0]
Kloridna kiselina (37 % = 10 M)	0,44 [26,0]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

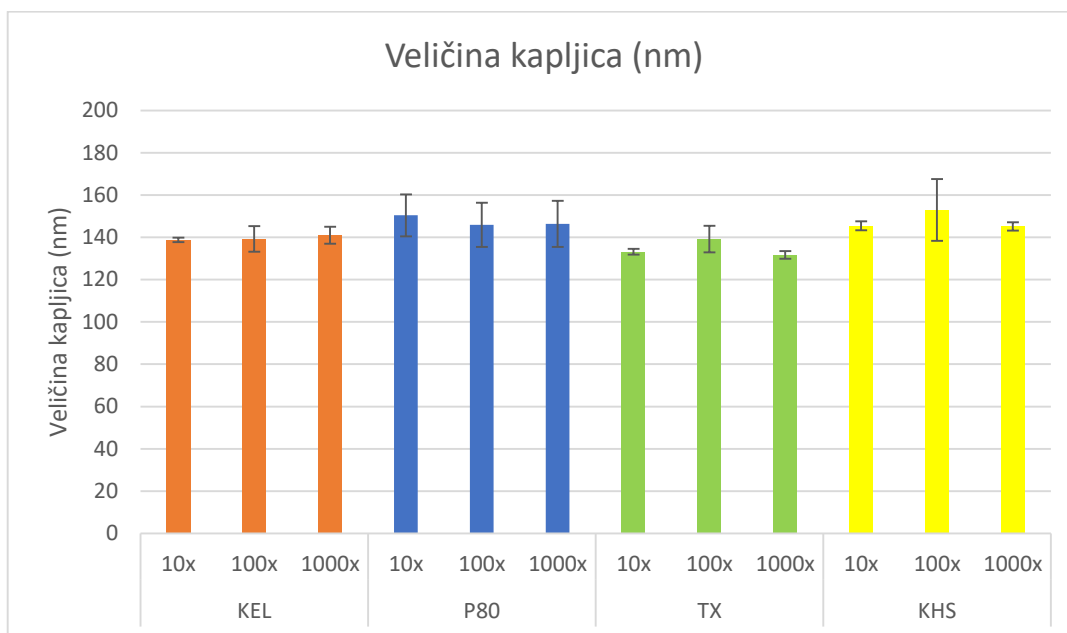
Oftalmičke nanoemulzije na tržištu su već više od 20 godina i postoji veliki interes za razvoj inovativnih i generičkih lijekova. S obzirom na njihovu složenost, kao i složenost i dinamiku površine oka, oftalmičke nanoemulzije još uvijek su nedovoljno poznat inovativni farmaceutski oblik, a što otežava razvoj generičkog lijeka. Nanoemulzije su kinetički stabilan oblik i ne očekuje se značajan utjecaj razrjeđenja vodom ili vanjskom fazom nanoemulzije na veličinu i raspodjelu veličine kapljica nanoemulzije. Međutim, nije poznato kako složeni medij kao što je suzna tekućina utječu na fizičko-kemijska svojstva nanoemulzija. Kako promjena fizičko-kemijskih svojstava nanoemulzija u suznoj tekućini na površini oka može imati značajan utjecaj na terapijski učinak, vrlo je važno razumijevanje ponašanja nanoemulzija u uvjetima simulirane izmjene suza.

Ovim radom razmatran je utjecaj razrjeđenja umjetnom suznom tekućinom na svojstva jednostavne nanoemulzije stabilizirane neionskom PAT. S tim ciljem prvo su pripravljene nanoemulzije sojinog ulja s četiri neionske PAT, makrogolglicerol ricinoleatom (Kolliphor® EL 35, KEL), polisorbitom 80, (P80), makrogol 15 hidrosistearatom (Kolliphor® HS 15, KHS) i tiloksapolom (TX). Kao sredstvo za izotonizaciju nanoemulzija korišten je glicerol (2,5%, *m/m*). Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije. Pripremljenim formulacijama izmjerene su veličina, raspodjela veličina i zeta-potencijal kapljica unutarnje faze. Nakon odabira najprikladnije neionske PAT, u sljedećem je koraku ispitivana stabilnost nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza.

### 4.1. Utjecaj razrjeđenja na veličinu i raspodjelu veličina kapljica nanoemulzije

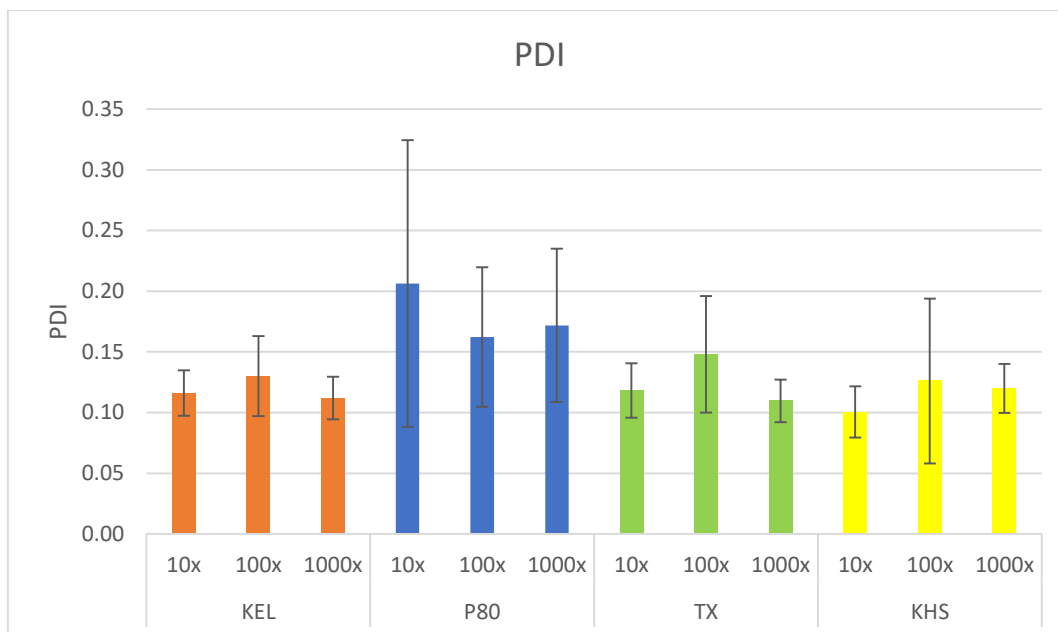
U nedavnom istraživanju provedena je detaljna analiza veličine i raspodjele veličina kapljica polidisperznih oftalmičkih nanoemulzija s uklopljenim ciklosporinom A (CsA) korištenjem pet fundamentalno različitih tehnika od kojih neke zahtijevaju, a neke ne zahtijevaju razrjeđenje uzorka (Petrochenko i sur., 2018.). Kao medij za razrjeđenje nanoemulzija korištena je ultračista voda, a autori su pokazali da razrjeđivanje nanoemulzija ultračistom vodom ne dovodi do značajne promjene u veličini i raspodjeli veličina kapljica unutarnje faze.

U ovom istraživanju određena je DLS tehnikom veličina kapljica unutarnje faze četiri nanoemulzije sojinog ulja s neionskom PAT (slika 7) pri razrjeđenju 10, 100 i 1000 puta redestiliranom vodom. Prosječna veličina kapljica nanoemulzija bila je ispod 160 nm, bez obzira na faktor razrjeđenja. Najmanja veličina kapljica karakterizira nanoemulziju s tiloksapolom, a najveća nanoemulziju s Kolliphor® HS 15.



Slika 7. Veličina kapljica unutarnje faze pripremljenih nanoemulzija s neionskom PAT pri razrjeđenju redestiliranom vodom 10, 100 i 1000 puta. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=3$ ).

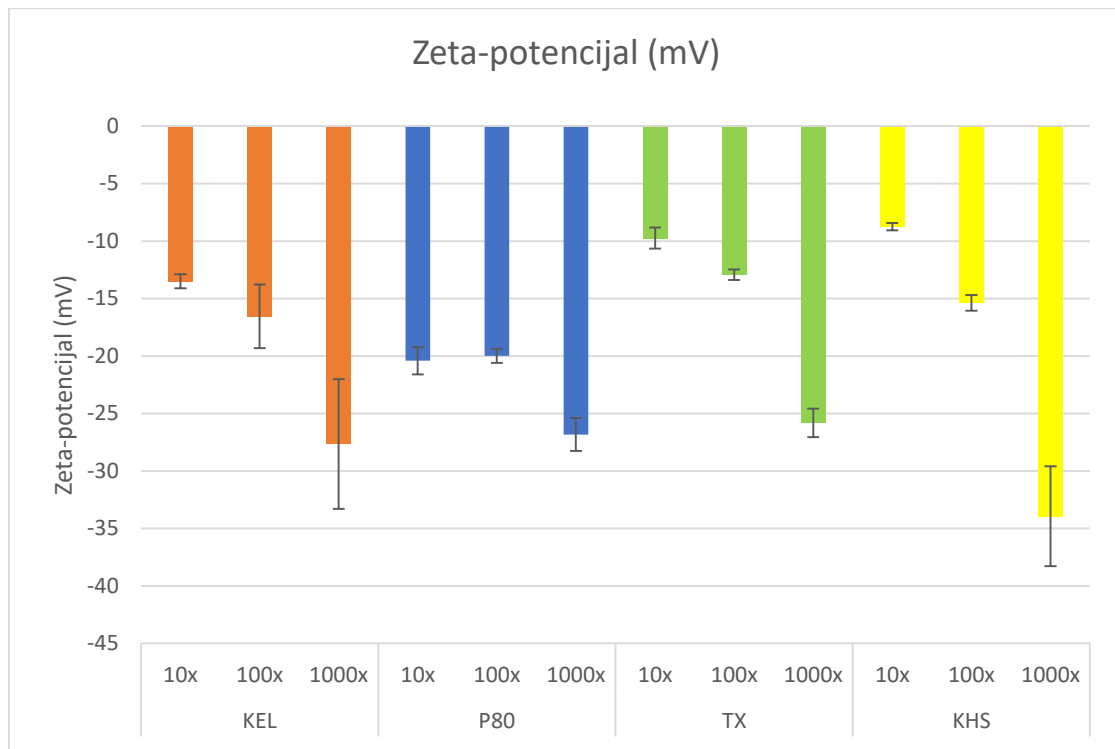
Rezultati određivanja indeksa polidisperznosti (PDI), koji daje podatak o raspodjeli veličina kapljica nanoemulzije, prikazani su slikom 8. Prosječne vrijednosti PDI za sve pripravljene nanoemulzije manje su 0,20. Najveći PDI karakterizira nanoemulzije s polisorbatom 80, uz najveću standardnu devijaciju. Razrjeđenjem ne dolazi do značajnije promjene vrijednosti PDI.



Slika 8. Indeks polidisperznosti (PDI) pripremljenih nanoemulzija s neionskom PAT pri razrjeđenju redestiliranom vodom 10, 100 i 1000 puta. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=3$ ).

#### 4.2. Utjecaj razrjeđenja na zeta-potencijal kapljica nanoemulzije

Elektroforetska pokretljivost temelji se na principu da jače nabijene čestice u električnom polju putuju brže prema elektrodi. Za određivanje zeta-potencijala nanoemulzije su razrjeđivane vanjskom fazom odnosno 2,5%-tnom otopinom glicerola. Za razliku od veličine i raspodjele veličine kapljica, razrjeđenjem nanoemulzija dolazi do značajne promjene zeta-potencijala (slika 9). Pri razrjeđenju od 1000 puta zeta-potencijal je značajno negativniji kod svih nanoemulzija, a najveći je za nanoemulziju s Kolliphor® HS 15.



Slika 9. Zeta-potencijal pripremljenih nanoemulzija s neionskom PAT pri razrjeđenju 2,5%-tnom otopinom glicerola 10, 100 i 1000 puta. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=3).

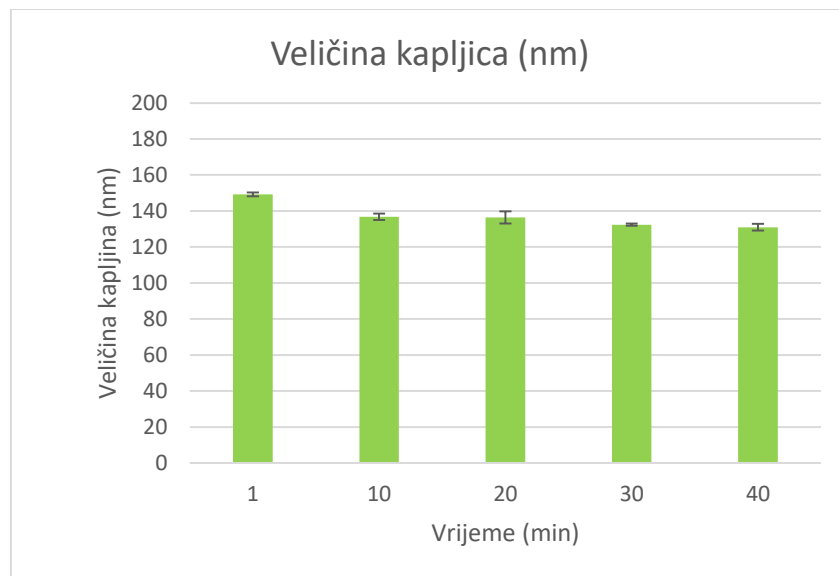
#### 4.3. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija u uvjetima simulirane izmjene suza

Na kliničku učinkovitost nanoemulzije uvelike utječu fiziološki procesi na površini oka, primjerice izmjena suza. Kako bi se poboljšao razvoj novih i generičkih formulacija, potrebno je moći predvidjeti stabilnost nanoemulzije nakon primjene na oko.

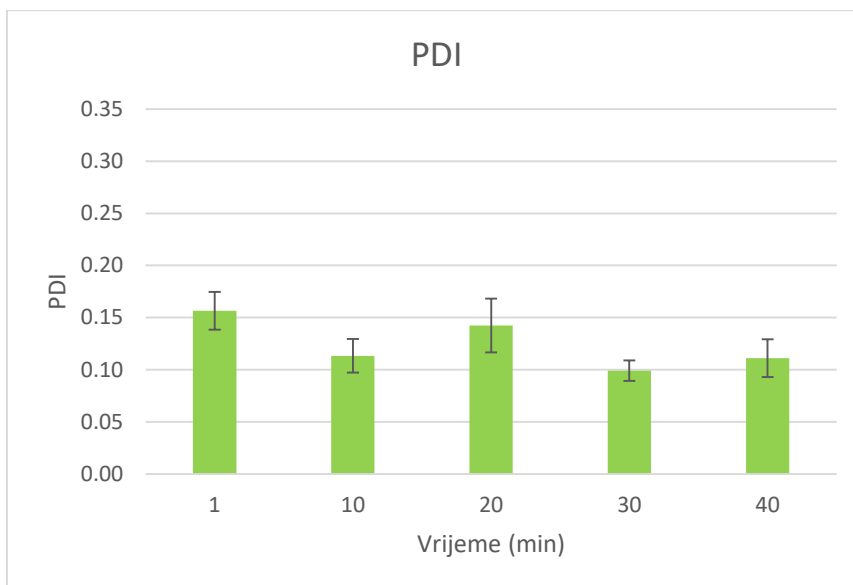
Ispitali smo promjene fizičko-kemijskih svojstava nanoemulzije pri simuliranoj izmjeni suza *in vitro*. Za simulaciju izmjene suza prvo je pripravljena jednostavna umjetna suzna tekućina (ATS) koja se sastoji od soli, uree i glukoze. Temeljem prethodnih određivanja veličine, raspodjele veličina i zeta-potencijala kapljica unutarnje faze pripremljenih nanoemulzija, za daljnje pokuse odabrana je nanoemulzija stabilizirana tiloksapolom. Naime, nanoemulziju s tiloksapolom karakterizira najmanja veličina kapljica i PDI. Nanoemulzija s tiloksapolom pomiješana je s ATS-om u volumnom omjeru 25:7 kako bi se imitirali *in vivo* uvjeti na površini oka – volumen primijenjene kapi za oko obično iznosi 25  $\mu\text{L}$ , a prosječni volumen suznog filma 7  $\mu\text{L}$ . Tijekom 40 minuta simulirana je izmjena suza koja se odvija brzinom 16%  $\text{min}^{-1}$  pri 34  $^{\circ}\text{C}$  i 50 rpm (Pepić, Lovrić i sur., 2014). Određene su veličina, PDI i zeta-potencijal kapljica

unutarnje faze nanoemulzije u 1., 10., 20., 30. i 40. minuti, što odgovara razrjeđenjima od otprilike 1,3, 6, 35, 200 i 1150 puta.

Na slikama 10 i 11 vidljivo je da simulirana izmjena suza nije uzrokovala značajne promjene u veličini kapljica i PDI. Osim razrjeđenja, na stabilnost nanoemulzije mogu utjecati i vrijeme inkubacije i temperatura (34 °C), no čini se da ni ti faktori nisu uzrokovali promjene. Veličina kapljica kretala se u rasponu od 130 do 150 nm, a PDI od 0,10 do 0,16 pri razrjeđenju od 1,3 do 1150 puta.

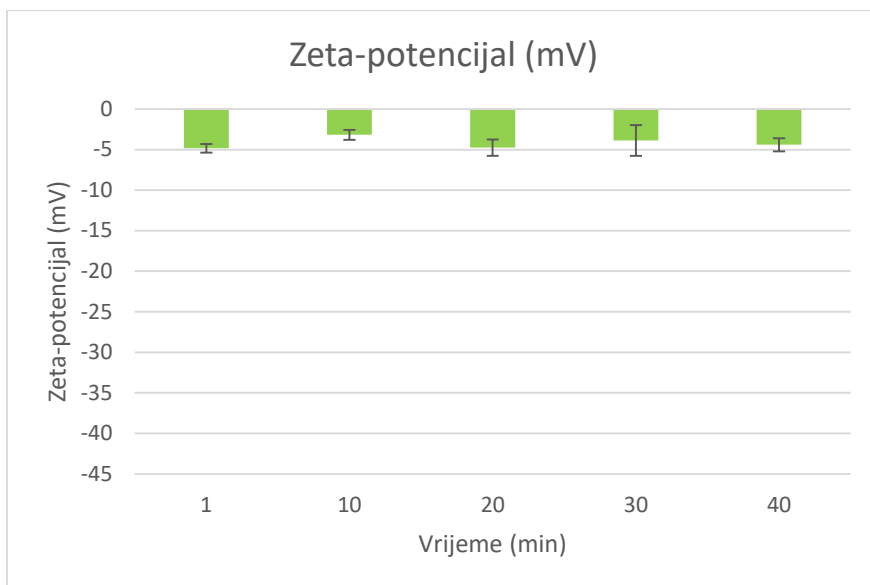


Slika 10. Ovisnost veličine kapljica nanoemulzije s tiloksapolom o vremenu pri uvjetima simulirane izmjene suza. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4).



Slika 11. Ovisnost indeksa polidisperznosti (PDI) nanoemulzije s tiloksapolom o vremenu pri uvjetima simulirane izmjene suza. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4).

Zeta-potencijal je faktor koji utječe na stabilnost nanoemulzije u slučaju ionskih PAT - jače nabijene kapljice međusobno se jače elektrostatski odbijaju (Jurišić Dukovski, 2021; Varenne i sur., 2019). Kod nanoemulzija neoionskih PAT, ključan mehanizam je sterička stabilizacija, ali s obzirom na razrjeđenje složenim medijem – ATS, ispitali smo i učinak na zeta-potencijal. Miješanjem nanoemulzije s ATS-om dolazi do razrjeđivanja nanoemulzije koje se tijekom opisanog pokusa povećava s vremenom te prati kinetiku prvog reda. Na slici 12. primjećujemo da su vrijednosti zeta-potencijala svih uzoraka blago negativne, što je i za očekivati kod formulacija s neionskim PAT. Za blago negativan zeta-potencijal zaslužna je prisutnost slobodnih masnih kiselina ulja ili pak adsorbiranih hidroksidnih iona iz vodene faze. No, apsolutne vrijednosti zeta-potencijala znatno su manje pri razrjeđenju s ATS-om nego s 2,5%-tnom otopinom glicerola. Razlog tomu pronalazimo u razlici u prirodi medija – glicerol je neutralnog naboja i nema utjecaj na naboj nanoemulzije, a ATS sadrži više vrsta soli koje disociraju i komprimiraju dvostruki električni sloj što smanjuje apsolutnu vrijednost zeta-potencijala (Aulton i Taylor, ured., 2018). Vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzije s tiloksapolom pri uvjetima simulirane izmjene suza kretale su se od -3,2 do -4,8 mV.



Slika 12. Ovisnost zeta-potencijala nanoemulzije s tiloksapolom o vremenu pri uvjetima simulirane izmjene suza. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=4).



## 5. ZAKLJUČCI

- Nanoemulzije s neionskim PAT uspješno su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije.
- Kao uljna faza korišteno je sojino ulje u udjelu od 5 % (*m/m*), a kao vodena faza redestilirana voda. Kao sredstvo za izotonizaciju dodan je glicerol u udjelu od 2,5 % (*m/m*). Od neionskih PAT korišteni su Kolliphor® EL, Tyloxapol, Polisorbat 80 i Kolliphor® HS 15, u udjelu od 1 % (*m/m*). Mikrofluidizacijom su dobivene mliječno-bijele nanoemulzije homogenog izgleda.
- U prvom je dijelu ispitivanja pripremljenim uzorcima izmjerena veličina, PDI i zeta-potencijal kapljica unutarnje faze te je prokomentiran utjecaj razrjeđivanja na spomenuta svojstva nanoemulzije. Sve pripravljene nanoemulzije karakterizira mala veličina kapljica, primjerene vrijednosti PDI, pH vrijednost u rasponu prihvatljivom za oftalmičku primjenu te negativan zeta-potencijal. Razrjeđenje redestiliranom vodom nije utjecalo na veličinu ni PDI kapljica nanoemulzije. Pri razrjeđenju od 1000 puta s vanjskom fazom (glicerolom) došlo je do značajnog porasta apsolutne vrijednosti zeta-potencijala nanoemulzije.
- U drugom je dijelu ispitivana stabilnost nanoemulzije s tiloksapolom u *in vitro* uvjetima simulirane izmjene suza. Tijekom pokusa nije došlo do značajnih promjena u veličini i PDI kapljica nanoemulzije. Izmjerene vrijednosti zeta-potencijala blago su negativne, no apsolutne su vrijednosti znatno manje pri razrjeđenju s ATS-om nego s 2,5%-tnom otopinom glicerola, što se može pripisati prisustvu soli u ATS-u. Povećavanjem faktora razrjeđenja nije došlo do značajnih promjena u vrijednostima zeta-potencijala.
- Nanoemulzije sojinog ulja stabilizirane tiloksapolom stabilne su pri uvjetima simulirane izmjene suza.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ATS – umjetna suzna tekućina (engl. *Artificial Tear Solution*)

BAK – benzalkonijev klorid

DEQ-5 – Upitnik o suhom oku (engl. *Dry Eye Questionnaire*)

DLS – dinamičko raspršivanje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*)

ELS – elektroforetsko raspršivanje svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*)

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

KEL - Kolliphor® EL

KHS - Kolliphor® HS 15

NF $\kappa$ B – jezgrin čimbenik  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*)

2D DOSY-NMR – nuklearna magnetska rezonanca (engl. *2-dimensional diffusion ordered spectroscopy nuclear magnetic resonance*)

OSDI – Indeks bolesti površine oka (engl. *Ocular Surface Disease Index*)

PCS – fotonska korelacijska spektroskopija (engl. *photon correlation spectroscopy*)

PDI – indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*)

P80 – Polysorbatum 80

siRNA – mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (engl. *small interfering ribonucleic acid*)

SPEED – Standardizirana procjena suhoće oka pacijenta (engl. *Standardized Patient Evaluation of Eye Dryness*)

TX – Tyloxapol

U/V – ulje u vodi

V/U – voda u ulju

## 7. LITERATURA

Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. Elsevier, 2018, str. 69.

Buckley RJ. Assessment and management of dry eye disease. *Eye (Lond)*, 2018, 32, 200-203.

Castro-Balado A, Mondelo-García C, Zarra-Ferro I, Fernández-Ferreiro A. New ophthalmic drug delivery systems. Nuevos sistemas de liberación de fármacos a nivel ocular. *Farm Hosp*, 2020, 44, 149-157.

Daul P, Amrane M, Ismail D, et al. Cationic Emulsion-Based Artificial Tears as a Mimic of Functional Healthy Tear Film for Restoration of Ocular Surface Homeostasis in Dry Eye Disease. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2020, 36, 355-365.

Dukovski BJ, Bračko A, Šare M, Pepić I, Lovrić J. In vitro evaluation of stearylamine cationic nanoemulsions for improved ocular drug delivery. *Acta Pharm*, 2019, 69, 621-634.

Eysuvis kapi za oko, <https://www.drugs.com/eyisuvis.html>, pristupljeno 20.09.2022.

FDA Inactive Ingredients Database, <https://www.fda.gov/>, pristupljeno 24.10.2022.

Gan L, Wang J, Jiang M, et al. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers. *Drug Discov Today*, 2013, 18, 290-297.

Gugleva V, Titeva S, Ermenlieva N, et al. Development and evaluation of doxycycline niosomal thermoresponsive in situ gel for ophthalmic delivery. *Int J Pharm*, 2020, 591, 120010.

Gupta A, Narsimhan V, Hatton TA, Doyle PS. Kinetics of the Change in Droplet Size during Nanoemulsion Formation. *Langmuir*, 2016, 32, 11551-11559.

Jones L, Downie LE, Korb D, et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf*, 2017, 15, 575-628.

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

Lorentz H, Heynen M, Kay LM, et al. Contact lens physical properties and lipid deposition in a novel characterized artificial tear solution. *Mol Vis*, 2011, 17, 3392-3405.

Macon R, Chauhan A. Ophthalmic delivery of hydrophilic drugs through drug-loaded oleogels. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 158, 105634.

Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int*, 2015, 112, 71-82.

Park SJ, Seo MK. Chapter 1 – Intermolecular Force. *Interface Sci. Technol*, 2011, 18, 1-57.

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, 31-44.

Petrochenko PE, Pavurala N, Wu Y, et al. Analytical considerations for measuring the globule size distribution of cyclosporine ophthalmic emulsions. *Int J Pharm*, 2018, 550, 229-239.

Qamar Z, Qizilbash FF, Iqbal MK, et al. Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2019, 13, 246-254.

Rouen PA, White ML. Dry Eye Disease: Prevalence, Assessment, and Management. *Home Healthc Now*, 2018, 36, 74-83.

Singh M, Bharadwaj S, Lee KE, Kang SG. Therapeutic nanoemulsions in ophthalmic drug administration: Concept in formulations and characterization techniques for ocular drug delivery. *J Control Release*, 2020, 328, 895-916.

Singh Y, Meher JG, Raval K, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252, 28-49.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, 2005, 10, 102-110.

Sosnowska K, Szymanska E, Winnicka K. Nanoemulsion with clotrimazole - design and optimalization of mean droplet size using microfluidization technique. *Acta Pol Pharm*, 2017, 74, 519-526.

Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58, 357-368.

Varenne F, Coty JB, Botton J, et al. Evaluation of zeta potential of nanomaterials by electrophoretic light scattering: Fast field reversal versus Slow field reversal modes. *Talanta*, 2019, 205, 120062.

Zetasizer Ultra Malvern Panalytical, <https://www.malvernpanalytical.com/>, pristupljeno 14.09.2022.

## 8. SAŽETAK / SUMMARY

Bolest suhog oka jedan je od najčešćih razloga posjeta oftalmologu i pogađa milijune ljudi. Karakteriziraju ju kronična upala, hiperosmolalnost suznog filma i smanjena debljina lipidnog sloja suznog filma, što uzrokuje simptome poput pečenja, svrbeža, crvenila i suzenja oka. Prva linija liječenja bolesti suhog oka primjena je bezreceptnih kapi za oko. Zadnjih nekoliko desetljeća istražuju se kapi za oko u obliku nanoemulzija te je odobreno nekoliko lijekova u tom obliku za liječenje bolesti suhog oka. Nanoemulzije tipa U/V daju mogućnost uklapanja slabo topljivih djelatnih tvari te dulje zadržavanje na mjestu primjene, a nude i simptomatsko liječenje bez djelatne tvari, zahvaljujući sinergizmu korištenih pomoćnih tvari u vidu stabilizacije i nadoknade suznog filma. Složeni su farmaceutski oblici s nekoliko fizičko-kemijskih parametara (primjerice, veličina, raspodjela veličina i zeta-potencijal kapljica unutarne faze) koji utječu na njihovu *in vivo* učinkovitost. Postoji veliki interes za razvoj inovativnih i generičkih lijekova temeljenih na tehnologiji nanoemulzija, ali zbog složenosti nanoemulzija taj je razvoj vrlo izazovan. Trenutno ne postoje biorelevantne *in vitro* metode konstruirane na temelju ključnih fizioloških i anatomskih aspekata površine oka, a koje bi omogućile učinkovit razvoj oftalmičkih nanoemulzija. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost oftalmičke nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza. U tu svrhu pripravljene su jednostavne U/V nanoemulzije stabilizirane neionskom PAT te je određen utjecaj razrjeđenja vodom ili vanjskom fazom nanoemulzije na veličinu i raspodjelu veličina te zeta-potencijal kapljica nanoemulzije. Potom je određena stabilnost jednostavne nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza korištenjem umjetne suzne tekućine koja sadržava soli, ureu i glukozu. Tijekom 40 minuta ispitivanja u uvjetima kontinuiranog biorelevantnog razrjeđenja nanoemulzije stabilizirane neionskom površinski aktivnom tvari nije uočena značajnija promjena veličine i raspodjele veličina te zeta-potencijala kapljica unutarnje faze.

Dry eye disease (DED) is one of the most common reasons for visiting an ophthalmologist and affects millions of people. It is characterized by chronic inflammation, hyperosmolarity of the tear film and reduced thickness of the lipid layer of the tear film, which causes symptoms such as burning, itching, redness and watering of the eye. The first line of treatment for DED is the use of over-the-counter (OTC) eye drops. For the last few decades, eye drops in the form of nanoemulsions have been researched, and several medicines in this form have been approved for treatment of DED. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions provide the possibility of incorporating lipophilic drugs and prolonging their retention time at the site of application. Furthermore, they offer symptomatic treatment without the active substance, thanks to the synergism of the excipients, by stabilizing and replacing of the tear film. They are complex pharmaceutical forms with several physicochemical parameters (such as size, polydispersity index and zeta-potential of the internal phase droplets) which affect their *in vivo* efficiency. There is great interest in the development of innovative and generic drugs based on nanoemulsion technology, but due to the complexity of nanoemulsions, this development is very challenging. Currently, there are no biorelevant *in vitro* methods constructed on the basis of key physiological and anatomical aspects of the eye surface, which would enable the effective development of ophthalmic nanoemulsions. The aim of this thesis is to examine the stability of ophthalmic nanoemulsion under the conditions of simulated tear turnover. For this purpose, simple O/W nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactant were prepared and the influence of dilution with water or the external phase of the nanoemulsion on the size and polydispersity index and zeta-potential of the nanoemulsion droplets was determined. Then, the stability of a simple nanoemulsion was determined under the conditions of simulated tear turnover using an artificial tear solution containing salts, urea and glucose. During 40 minutes of testing under conditions of continuous biorelevant dilution of the nanoemulsion stabilized with a nonionic surfactant, no significant change in the size, polydispersity index and zeta-potential of the internal phase droplets was observed.

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Ispitivanje stabilnosti oftalmičkih nanoemulzija pri uvjetima simulirane izmjene suza

**Dorja Cepetić**

### SAŽETAK

Bolest suhog oka jedan je od najčešćih razloga posjeta oftalmologu i pogađa milijune ljudi. Karakteriziraju ju kronična upala, hiperosmolalnost suznog filma i smanjena debljina lipidnog sloja suznog filma, što uzrokuje simptome poput pečenja, svrbeža, crvenila i suzenja oka. Prva linija liječenja bolesti suhog oka primjena je bezreceptnih kapi za oko. Zadnjih nekoliko desetljeća istražuju se kapi za oko u obliku nanoemulzija te je odobreno nekoliko lijekova u tom obliku za liječenje bolesti suhog oka. Nanoemulzije tipa U/V daju mogućnost uklapanja slabo topljivih djelatnih tvari te dulje zadržavanje na mjestu primjene, a nude i simptomatsko liječenje bez djelatne tvari, zahvaljujući sinergizmu korištenih pomoćnih tvari u vidu stabilizacije i nadoknade suznog filma. Složeni su farmaceutski oblici s nekoliko fizičko-kemijskih parametara (primjerice, veličina, raspodjela veličina i zeta-potencijal kapljica unutarne faze) koji utječu na njihovu *in vivo* učinkovitost. Postoji veliki interes za razvoj inovativnih i generičkih lijekova temeljenih na tehnologiji nanoemulzija, ali zbog složenosti nanoemulzija taj je razvoj vrlo izazovan. Trenutno ne postoje biorelevantne *in vitro* metode konstruirane na temelju ključnih fizioloških i anatomskih aspekata površine oka, a koje bi omogućile učinkovit razvoj oftalmičkih nanoemulzija. Cilj ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost oftalmičke nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza. U tu svrhu pripravljene su jednostavne U/V nanoemulzije stabilizirane neionskom PAT te je određen utjecaj razrjeđenja vodom ili vanjskom fazom nanoemulzije na veličinu i raspodjelu veličina te zeta-potencijal kapljica nanoemulzije. Potom je određena stabilnost jednostavne nanoemulzije u uvjetima simulirane izmjene suza korištenjem umjetne suzne tekućine koja sadržava soli, ureu i glukozu. Tijekom 40 minuta ispitivanja u uvjetima kontinuiranog biorelevantnog razrjeđenja nanoemulzije stabilizirane neionskom površinski aktivnom tvari nije uočena značajnija promjena veličine i raspodjele veličina te zeta-potencijala kapljica unutarnje faze.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanoemulzija, bolest suhog oka, tiloksapol, mikrofluidizacija, umjetna suzna tekućina

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

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

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: studeni 2022.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutics  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Stability testing of ophthalmic nanoemulsions under conditions of simulated tear turnover

Dorja Cepetić

#### SUMMARY

Dry eye disease (DED) is one of the most common reasons for visiting an ophthalmologist and affects millions of people. It is characterized by chronic inflammation, hyperosmolarity of the tear film and reduced thickness of the lipid layer of the tear film, which causes symptoms such as burning, itching, redness and watering of the eye. The first line of treatment for DED is the use of over-the-counter (OTC) eye drops. For the last few decades, eye drops in the form of nanoemulsions have been researched, and several medicines in this form have been approved for treatment of DED. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions provide the possibility of incorporating lipophilic drugs and prolonging their retention time at the site of application. Furthermore, they offer symptomatic treatment without the active substance, thanks to the synergism of the excipients, by stabilizing and replacing of the tear film. They are complex pharmaceutical forms with several physicochemical parameters (such as size, polydispersity index and zeta-potential of the internal phase droplets) which affect their *in vivo* efficiency. There is great interest in the development of innovative and generic drugs based on nanoemulsion technology, but due to the complexity of nanoemulsions, this development is very challenging. Currently, there are no biorelevant *in vitro* methods constructed on the basis of key physiological and anatomical aspects of the eye surface, which would enable the effective development of ophthalmic nanoemulsions. The aim of this thesis is to examine the stability of ophthalmic nanoemulsion under the conditions of simulated tear turnover. For this purpose, simple O/W nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactant were prepared and the influence of dilution with water or the external phase of the nanoemulsion on the size and polydispersity index and zeta-potential of the nanoemulsion droplets was determined. Then, the stability of a simple nanoemulsion was determined under the conditions of simulated tear turnover using an artificial tear solution containing salts, urea and glucose. During 40 minutes of testing under conditions of continuous biorelevant dilution of the nanoemulsion stabilized with a nonionic surfactant, no significant change in the size, polydispersity index and zeta-potential of the internal phase droplets was observed.

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

Thesis includes: 35 pages, 12 figures, 2 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanoemulsion, dry eye disease, tyloxapol, microfluidization, artificial tear solution

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

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

The thesis was accepted: November 2022.