

# In situ gelirajuće oftalmičke nanoemulzije za liječenje bolesti suhog oka

---

Đurek, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:076120>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

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



**Marta Đurek**

***In situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije za  
liječenje bolesti suhog oka**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju, pod stručnim vodstvom dr.sc. Bisere Jurišić Dukovski. Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2019-04-2174.

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc.Biseri Jurišić Dukovski na stručnom vodstvu, susretljivosti i savjetima prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela i tijekom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su uvijek bili najveća podrška u svakom smislu te riječi. Veliko hvala mojim sestrama Barbari i Mirjani i braći Branimiru i Dominiku za svaku riječ ohrabrenja, svaku čašicu (razgovora), svaku (jednostrano) isprintanu skriptu i svako suzdržavanje od pitanja 'kako faks?'*

*Neizmjerne sam zahvalna svojim prijateljicama Nikolini i Teni koje su nerijetko vjerovale u mene više nego ja sama, radovale se svakoj mojoj maloj pobjedi i bile ogromna podrška. Hvala mojim prijateljima i kolegama s faksa (posebno Anji!) na svemu što je u bilo kojem smislu olakšalo, uljepšalo i upotpunilo ovih 5 godina studiranja.*

# SADRŽAJ

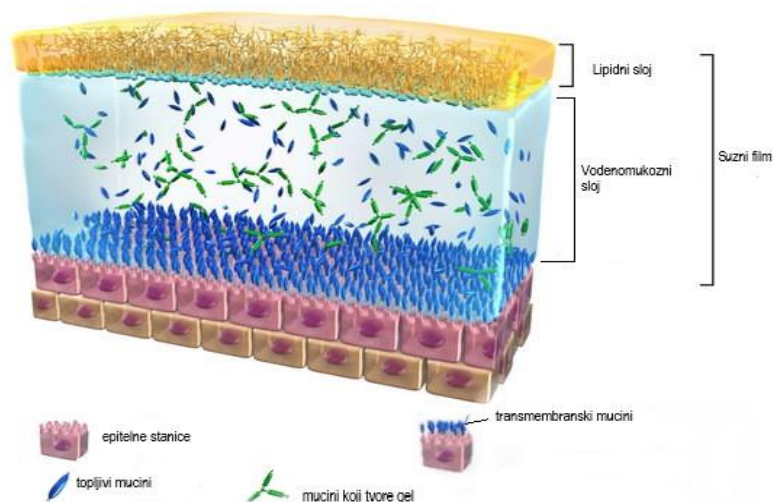
1. UVOD.....	1
1.1. Površina oka.....	1
1.2. Bolest suhog oka .....	2
1.2.1. Podjela bolesti suhog oka .....	2
1.2.2. Mehanizam nastanka bolesti suhog oka.....	3
1.2.3. Terapijske opcije.....	3
1.2.3.1. Nefarmakološke mjere.....	4
1.2.3.2. Umjetne suze.....	4
1.2.3.3. Farmakoterapija .....	5
1.3. Nanoemulzije za oftalmičku primjenu.....	6
1.3.1. Pomoćne tvari .....	7
1.3.2. Metode pripreme nanoemulzija.....	8
1.4. <i>In situ</i> gelirajući oftalmički sustavi .....	10
1.5. Gelan guma.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Materijali .....	16
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Priprema nanoemulzija .....	16
3.2.2. Ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava nanoemulzija.....	17
3.2.2.1. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti .....	17
3.2.2.2. Mjerenje zeta potencijala .....	18
3.2.2.3. Mjerenje pH vrijednosti .....	18
3.2.2.4. Mjerenje osmolalnosti .....	18
3.2.3. Mjerenje viskoznosti nanoemulzija .....	18
3.2.4. Mjerenje viskoznosti nanoemulzija nakon miješanja s umjetnom suznom tekućinom .....	19
3.2.5. Test promjene amplitude.....	20
3.2.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Priprema i karakterizacija <i>in situ</i> gelirajućih oftalmičkih nanoemulzija .....	21
4.2. Krivulja viskoznosti nanoemulzija prije i nakon miješanja s umjetnom suznom tekućinom .....	26
4.3. Test promjene amplitude .....	30

4.4. Stabilnost nanoemulzija .....	33
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	39
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	43

# 1. UVOD

## 1.1. Površina oka

Površina oka je funkcionalna jedinica koju čine različite komponente čiji je cilj očuvanje zdravlja i funkcije oka. Sastoji se od epitela rožnice, epitela bulbarne spojnice te tankog sloja suznog filma. Suzni film prekriva površinu oka i predstavlja važan čimbenik u podmazivanju površine oka, zaštiti od mikroorganizama, osiguravanju glatke površine oka za refrakciju svjetlosti te opskrbi avaskularne rožnice hranjivim tvarima (Rolando i Zierhut, 2001). Razlikuju se vodenomukozni sloj gela i tanki lipidni sloj suznog filma. Vodenomukozni sloj gela je dio suznog filma koji je u direktnom kontaktu s epitelom rožnice i spojnice dok ga lipidni sloj prekriva i čini dio koji je u izravnom kontaktu sa zrakom. Vodena komponenta suznog filma i sekretorni mucini, koji se dijele na mucine koji stvaraju gel i topljive mucine koji nemaju mogućnost stvaranja gela, te transmembranski mucini čine vodenomukozni sloj gela suznog filma. Lipidni sloj suznog filma nastaje iz meibuma kojeg izlučuju Meibomove žlijezde smještene na rubovima vjeđa. Uloga lipidnog sloja je smanjivanje površinske napetosti suznog filma i usporavanje isparavanja vodene komponente suznog filma (Jurišić Dukovski, 2021; Willcox i sur., 2017).



**Slika 1.** Struktura suznog filma (preuzeto i prilagođeno prema Kawahara, 2023)

## **1.2. Bolest suhog oka**

Bolest suhog oka je kompleksna, multifaktorijalna bolest površine oka karakterizirana gubitkom homeostaze suznog filma, praćena nizom simptoma kojima dominiraju nelagoda i smetnje vida. Poremećaj homeostaze suznog filma posljedica je njegove nestabilnosti i hiperosmolarnosti te upale površine oka i neurosenzornih abnormalnosti. Kako bolest suhog oka ne može biti okarakterizirana jedinstvenim procesom, znakom ili simptomom, definiramo ju kao multifaktorijalnu (Craig i sur., 2017). Prevalencija bolesti suhog oka je u rasponu od 5% do 50%, čak i do 75% kod osoba starijih od 40 godina. U populaciji starosne dobi između 18 i 45 godina samo 2,7% osoba se susrelo s tom bolešću (Rouen i White, 2018). Faktori rizika uključuju osobne čimbenike, okolišne čimbenike, kronične bolesti i lijekove. U osobne čimbenike ubrajamo dob, spol, rasu i korištenje kontaktnih leća. Kod ženskog spola je veća prevalencija bolesti, pogotovo u postmenopauzi. Primjena estrogena ili kombinacije estrogena i progestina može pogoršati simptome dok primjena androgena može djelovati suprotno, tj. olakšati simptome (Rouen i White, 2018). Okolišni čimbenici koji mogu predstavljati rizik od bolesti suhog oka jesu područja niske relativne vlažnosti zraka i velike vjetrovitosti, boravak u klimatiziranim prostorima, dugotrajno izlaganje ekranima (računala, tableti, pametni telefoni) i provođenje više vremena čitajući (Rouen i White, 2018).

### **1.2.1. Podjela bolesti suhog oka**

Dva glavna etiopatogenetska tipa bolesti suhog oka su hiposekretorni tip i hiperevaporacijski tip (Bron i sur., 2017). Hiposekrecijski tip nastaje zbog smanjenog izlučivanja suza što može biti posljedica Sjögrenovog sindroma te drugih stanja ili bolesti. Sjögrenov sindrom je autoimuna bolest egzokrinih žlijezda, poglavito suznih žlijezda i žlijezda slinovnica (Kuklinski i sur., 2017). Od ostalih stanja, starenje je najčešći uzrok hiposekrecijskog tipa bolesti kada dolazi do smanjene funkcije suznih žlijezda i reducirane osjetljivosti rožnice na vanjske podražaje. Hiperevaporacijski tip nastaje zbog prekomjernog isparavanja suza i većinom je posljedica disfunkcije Meibomovih žlijezda. Opstrukcija Meibomovih žlijezda je najčešći razlog njihove disfunkcije. Ostali uzročnici disfunkcije su: rosacea, atopijski i seboreični dermatitis, psorijaza, ihtioza te primjena tretinoina u liječenju akni (Jurišić Dukovski, 2021). Oko 10% pacijenata ima bolest suhog oka hiposekrecijskog tipa, dok više od 80% njih ima hiperevaporacijski tip, ili kombinaciju oba tipa bolesti (Rouen i White, 2018).

### **1.2.2. Mehanizam nastanka bolesti suhog oka**

Glavnu ulogu u patogenezi bolesti suhog oka ima hiperosmolarnost suznog filma, a razlog zbog kojeg dolazi do hiperosmolarnosti je smanjeno izlučivanje suza ili njihovo prekomjerno isparavanje (Jurišić Dukovski, 2021). Vrijednosti osmolarnosti kod zdravog oka iznose približno  $302 \pm 8$  mOsm  $\text{kg}^{-1}$ , dok vrijednosti od  $315 \pm 10$  mOsm  $\text{kg}^{-1}$  i  $336 \pm 22$  mOsm  $\text{kg}^{-1}$  ukazuju na umjeren i teški oblik bolesti suhog oka (Bron i sur., 2017). Hiperosmolarnost suznog filma rezultira oštećenjem površine oka neposrednim, ali i posrednim mehanizmima putem kaskadnih upalnih reakcija (Jurišić Dukovski, 2021). Upala dovodi do nestabilnosti suznog filma koja u svojoj pozadini obuhvaća apoptozu epitelnih stanica rožnice i spojnice oka, vrčastih stanica spojnice oka te pojačanu deskvamaciju epitelnih stanica rožnice. Kaskada upalnih reakcija potiče sintezu i lučenje proupalnih citokina, metaloproteinaza izvanstaničnog matriksa, proapoptotičkih čimbenika te čimbenika nekroze tumora  $\alpha$ . Medijatori upale i hiperosmolarnost suznog filma rezultiraju smanjenom ekspresijom transmembranskih mucina i dovode do apoptoze epitelnih stanica spojnice i rožnice, te vrčastih stanica spojnice. Posljedično, manjak vrčastih stanica dovodi do niske koncentracije mucina koji su odgovorni za stvaranje gela u suznom filmu i time se značajno narušava stabilnost suznog filma i mogućnost optimalnog močenja površine oka (Jurišić Dukovski, 2021). Navedeni patofiziološki procesi započinju i održavaju tzv. začarani krug bolesti suhog oka – prerano pucanje suznog filma nakon treptaja (nestabilan suzni film), što dovodi do isušivanja i hiperosmolarnosti površine oka. Kaskada mehanizama, uključujući osmotski, mehanički i upalni stres, narušava obrambeni mehanizam površine oka i vodi ka daljnjem pucanju suznog filma čime se zatvara i nastavlja začarani krug (Baudouin i sur., 2016).

### **1.2.3. Terapijske opcije**

Kako je bolest suhog oka multifaktorijalne etiologije, liječenje je kompleksno. Prioritetno je utvrditi točnu dijagnozu, odrediti uzrok, dominantni tip bolesti i stupanj inteziteta simptoma bolesti kako bi pristup liječenju bio ispravan. Cilj kojem se teži prilikom liječenja bolesti suhog oka jest ponovno postizanje homeostaze površine oka i samim time prekid začaranog kruga bolesti (Jurišić Dukovski, 2021).



### **1.2.3.1. Nefarmakološke mjere**

Liječenje bolesti suhog oka uključuje i nefarmakološke mjere: edukaciju pacijenta, prilagodbu uvjeta života i optimizaciju prehrambenih navika. Za prilagodbu uvjeta života predlaže se korištenje ovlaživača zraka u domu i radnom okruženju, prestanak pušenja (uključujući i pasivno pušenje) te izbjegavanje duljih razdoblja provedenih u vožnji, čitajući ili gledajući ekrane kako bi se smanjilo naprezanje očiju. Promjene u prehrani nalažu povećan unos namirnica bogatih omega-3 masnim kiselinama i vitaminom A (Rouen i White, 2018).

### **1.2.3.2. Umjetne suze**

Umjetne suze su često prva linija liječenja i predstavljaju zamjenu za prirodne suze. Imaju ulogu olakšavanja simptoma, ali često bez učinka na oštećenja površine oka (Yao i sur., 2011). Niže su navedene vrste umjetnih suza i preporuke za njihovu primjenu:

- Umjetne suze s lipidima primjenjive su u bolesnika s disfunkcijom Meibomovih žlijezda budući da stabiliziraju suzni film povećavanjem debljine lipidnog sloja suznog filma (Yao i sur., 2011).
- Umjetne suze bez konzervansa korisne su kod bolesnika s umjerenim do teškim oblikom bolesti koji ih primjenjuju više od 4 puta dnevno. Takvi pripravci osiguravaju manji rizik od oštećenja površine oka uslijed izloženosti konzervansima (Yao i sur., 2011).
- Umjetne suze s osmoprotektantima primjenjuju se kod bolesnika s hiperevaporacijskim tipom bolesti jer osiguravaju osmotsku zaštitu, povećavaju unutarstaničnu osmolarnost i štite epitel od oksidativnog stresa. Osmoprotektanti (npr. betain i L-karnitin) uravnotežuju osmotski tlak bez ometanja metabolizma stanica i smanjuju upalu nastalu osmotskim stresom (Jones i sur., 2017).
- Hipotonične umjetne suze učinkovito smanjuju hiperosmolarnost suznog filma te se njihova primjena predlaže kod oba tipa bolesti suhog oka (Li i sur., 2017; Yao i sur., 2011). Međutim, potrebna su dodatna istraživanja koja bi pokazala njihov točan učinak na simptome i tijek bolesti (Jones i sur., 2017).

Kako bi se postiglo njihovo produljeno zadržavanje na površini oka, umjetnim se suzama dodaju tvari za povećanje viskoznosti kao što su derivati celuloze, prirodni glikozaminoglikan hijaluronske kiseline ili galaktomanan hidroksipropilguar (Jurišić Dukovski, 2021).

Povećanjem visokoznosti produljuje se djelovanje, ali i otvara mogućnost privremenog zamućenja vida (Phadattare i sur., 2015).

### 1.2.3.3. Farmakoterapija

Kod umjereno teškog i teškog oblika bolesti suhog oka uglavnom je potrebna farmakoterapija. Primarni fokus farmakoterapije je liječenje upalne komponente bolesti. Odobreni lijekovi za terapiju bolesti suhog oka uključuju imunomodulatore, antagoniste integrina, sekretagoge mucina i/ili vodene komponente suza (Jurišić Dukovski, 2021).

Ciklosporin A je ciklički peptid sastavljen od 11 aminokiselina koji djeluje protuupalno i imunomodulatorno. U SAD-u je Agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila prvi lijek za liječenje bolesti suhog oka - kapi za oko s 0,05 % ciklosporina A u obliku anionske nanoemulzije (Restasis®), dok su u Europi nekoliko godina kasnije odobrene kapi za oko s 0,1% ciklosporina A, u obliku kationske nanoemulzije (Ikervis®) ([www.drugs.com](http://www.drugs.com); [www.restasis.com](http://www.restasis.com)).

Topikalni glukokortikoidi također se mogu koristiti za liječenje bolesti suhog oka. Njihovo protuupalno djelovanje učinkovito otklanja simptome bolesti. Nedostatak im je vremenski ograničena upotreba (otprilike dva tjedna) zbog rizika od ozbiljnih nuspojava kao što su povišen očni tlak te pojava katarakte i oportunističkih infekcija (Sheppard i sur., 2016). Posebno istaknut glukokortikoid je loteprednolabetonolol koji predstavlja manji rizik za pojavu ozbiljnih nuspojava i otvara mogućnost dugotrajnije primjene. Manji potencijal za izazivanje nuspojava loteprednolabetonolola proizlazi iz njegove kemijske strukture zbog koje se hidrolitički razgrađuje na inaktivne metabolite nakon vezanja za receptore (Sheppard i sur., 2016). FDA je u listopadu 2020. godine odobrila kapi za oko Eysuvis® (Kala Pharmaceuticals, Inc.) koje sadrže loteprednolabetonolol (0,25%) u obliku suspenzije mukopenetrirajućih nanokristala te on predstavlja prvi odobreni glukokortikoid za kratkotrajnu topikalnu terapiju bolesti suhog oka ([www.drugs.com](http://www.drugs.com); [www.eysuvis-ecp.com](http://www.eysuvis-ecp.com)).

Lifitegrast je antagonist integrina koji ima protuupalno djelovanje sprečavajući vezanje T-limfocita na endotel kapilara i njihovu migraciju u okolna tkiva. 2016. godine FDA je odobrila kapi za oko u obliku 5%-tne oftalmičke otopine lifitegrasta - Xiidra® (Haber i sur., 2019; [www.drugs.com](http://www.drugs.com)).

Dikvafosol i rebamipid, topikalni sekretagozi, još su jedna terapijska opcija za liječenje bolesti suhog oka. Dikvafosol je odobren u Japanu i Južnoj Koreji u obliku kapi za oko - otopine (3%)

(Diquas®), dok je rebamipid odobren je u Japanu u obliku kapi za oko - suspenzije (2%) (Mucosta®) (Jones i sur., 2017).

Postoje i opcije tzv. „off-label“ primjene određenih lijekova za liječenje bolesti suhog oka kao što su azitromicin i tetraciklini. Njihova se učinkovitost, osim na antibakterijskom djelovanju, temelji i na protuupalnom djelovanju. Također je utvrđeno da azitromicin izravno djeluje na epitelne stanice Meibomovih žlijezda čime pospješuje njihovu funkciju. Azitromicin se primjenjuje peroralno, ali postoji mogućnost i topikalne oftalmičke primjene dok je primjena tetraciklina ograničena na peroralnu primjenu. Optimalan režim doziranja za oba lijeka i oba puta primjene još uvijek nije definiran (Jones i sur., 2017; Liu i sur., 2015).

Parasimpatomimetici, pilokarpin i cevimelin, stimuliraju sekreciju sline i suza. Međutim, odobreni su od strane FDA za terapiju suhoće usta kao posljedice Sjögrenovog sindroma, ne i za bolest suhog oka, iako studije ukazuju na jednaku učinkovitost kod oba stanja (Kuklinski i sur., 2017).

Potencijal za primjenu kod bolesti suhog oka pokazali su i topikalni nesteroidni protuupalni lijekovi koji su prilikom kliničkih istraživanja pokazali osmoprotektivni učinak. Konkretnije, diklofenak je na modelu bolesti suhog oka štakora pokazao protektivno djelovanje dok je kod bromfenaka taj učinak izostao. Međutim, uočeni su pojedini slučajevi stanjenja rožnice kao posljedica primjene topikalnih nesteroidnih protuupalnih lijekova stoga je potreban oprez prilikom propisivanja tih lijekova pacijentima (Jones i sur., 2017).

### **1.3. Nanoemulzije za oftalmičku primjenu**

Nanoemulzije su disperzije dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju, a stabilizirane su prikladnim površinski aktivnim tvarima. Nanoemulzije su kinetički stabilni, ali termodinamički nestabilni sustavi (Singh i sur., 2017). Postoje nanoemulzije tipa ulje u vodi (U/V), voda u ulju (V/U) te mješoviti tip U/V/U ili V/U/V. Prosječan promjer kapljica nanoemulzija je manji od 500 nm (Singh i sur., 2017). U oftalmičkoj primjeni koriste se nanoemulzije tipa U/V zbog mogućnosti miješanja sa suznim filmom, a raspon promjera kapljica unutarnje (uljne) faze najčešće je 20-200 nm (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Mala veličina kapljica omogućuje veliku ukupnu površinu za oslobađanje djelatne tvari čime ona postaje dostupna za apsorpciju (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2017). Prednosti nanoemulzija u oftalmičkoj primjeni su mogućnost miješanja sa suznim filmom, uklapanje lipofilnih, slabo topljivih djelatnih tvari te bolja podnošljivost u odnosu na konvencionalne farmaceutske oblike. Nanoemulzije

predstavljaju funkcionalne nanosustave koji učinkovito nadoknađuju sve slojeve suznog filma (vodeni, mucinski i lipidni) čime povećavaju stabilnost i volumen suznog filma što je od presudne važnosti u liječenju bolesti suhog oka, čak i bez uklopljene djelatne tvari (Singh i sur., 2020). Interakcija oftalmičkih nanoemulzija s lipidnim komponentama suznog filma rezultira duljim zadržavanjem djelatne tvari na mjestu primjene te osigurava dobru apsorpciju djelatne tvari preko rožnice u dublja tkiva oka (Qamar i sur., 2019).

### **1.3.1. Pomoćne tvari**

Razvoj oftalmičkih nanoemulzija, zbog specifičnosti mjesta primjene, zahtijeva opsežno razumijevanje farmaceutskih, kao i tehnoloških aspekata povezanih s odabirom pomoćnih tvari i procesa izrade formulacije (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Glavne uloge pomoćnih tvari su omogućena priprava nanoemulzija prikladnih svojstava, osiguravanje stabilnosti formulacije i uklapanje djelatne tvari, uz neizostavnu sigurnost primjene (Jurišić Dukovski, 2021).

Vrsta i udio uljne faze ovise poglavito o topljivosti djelatne tvari. Potrebno je postići dovoljnu topljivost djelatne tvari u ograničenom udjelu uljne faze. Niska površinska napetost i niska viskoznost idealne su karakteristike ulja korištenih u izradi nanoemulzija. Također, parametar koji treba uzeti u obzir je kompatibilnost ulja s ostalim pomoćnim tvarima u formulaciji (Singh i sur., 2020). Primjeri ulja koja su u upotrebi za oftalmičku primjenu jesu Eutanol G (oktildodekanol), trigliceridi srednje duljine lanaca, ricinusovo ulje, kikirikijevo ulje, sojino ulje, sezamovo ulje, izopropil miristat i tekući parafin (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020)

Površinski aktivne tvari (PAT), tzv. surfaktanti su organske amfipatske molekule koje sadrže barem jednu polarnu (hidrofilnu) i nepolarnu (hidrofobnu) skupinu u svojoj strukturi. Surfaktanti stabiliziraju nanoemulzije tako što se adsorbiraju na međupovršinu između faza i smanjuju površinsku napetost na način da se hidrofilni dio orijentira prema vodenoj fazi, a hidrofobni prema uljnoj fazi. Nakon adsorpcije PAT trebaju pružiti dovoljno jake odbojne sile (elektrostatske ili steričke) kako bi spriječile spajanje uljnih kapljica (Singh i sur., 2017). Postoje različite vrste PAT: amfoterne, neionske, anionske i kationske. Neionske PAT, poput polisorbata, tiloksapola ili kremofora prikladne su za oftalmičku primjenu zbog niskog iritacijskog potencijala (Jurišić Dukovski, 2021; Singh i sur., 2020). Lecitin, koji predstavlja

smjesu fosfolipida, također je prikladna PAT za oftalmičku primjenu. Dodatna prednost za primjenu lecitina u ulozi površinski aktivne tvari je činjenica da u smjesi fosfolipida sadrži i one koji su fiziološki prisutni u suznom filmu (Jurišić Dukovski, 2021). Kosurfaktanti djeluju sinergistički s PAT prilikom smanjenja međupovršinske napetosti te se njihovom primjenom smanjuje potrebna koncentracija PAT. Kao kosurfaktanti za oftalmičku primjenu mogu se koristiti propilen glikol, polietilenglikol i glicerol (Singh i sur., 2020).

Konzervansi sprječavaju kontaminaciju formulacije mikroorganizmima, a u slučaju kapi za oko najčešće se koristi benzalkonijev klorid (BAK). Učinkovitost te smjese kvarternih amonijevih spojeva temelji se na interakcijama s negativno nabijenim membranama mikroorganizama što rezultira izlaskom staničnog sadržaja i smrću mikroorganizama. Negativna strana BAK-a je neselektivnost, tj. jednako djelovanje i na membrane epitelnih stanica rožnice, spojnice i vrčastih stanica spojnice oka. Sukladno tome, dugotrajna i kronična primjena oftalmičkih pripravaka s BAK-om se treba izbjegavati, a kod teških oblika bolesti suhog oka preporučuje se korištenje nekonzerviranih kapi za oko (Jurišić Dukovski, 2021).

Tvari za povećanje viskoznosti omogućuju produljen kontakt nanoemulzije s površinom oka, dodatno povećavaju debljinu suznog filma i samim time osiguravaju potpuniju zaštitu površine oka (Jurišić Dukovski, 2021). Tvari koje se najčešće koriste u tu svrhu su hidrosimetilceluloza, polivinilni alkohol, polivinilpirolidon, hijaluronska kiselina, tragakant guma i kasnanska guma (Castro-Balado i sur., 2020).

Ostale pomoćne tvari uključuju tvari za izotonizaciju i prilagodbu pH vrijednosti, pufere, nositelje pozitivnog naboja, pročišćenu vodu i osmoprotektante. Pufere nije nužno koristiti jer se pH vrijednost suza, nakon primjene oftalmičke nanoemulzije drukčije pH vrijednosti, ubrzo vrati na fiziološke vrijednosti zbog velikog puferskog kapaciteta suza (Jurišić Dukovski, 2021).

### **1.3.2. Metode pripreme nanoemulzija**

S obzirom na to da su nanoemulzije termodinamički nestabilni sustavi, za njihovu pripravu nužno je uložiti energiju. Ovisno o izvoru uložene energije u pripravu nanoemulzija, metode su podijeljene na niskoenergetske i viskoenergetske. Koji će tip nanoemulzije nastati, ovisi o

volumnom udjelu pojedine faze (faza koja prevladava bit će vanjska faza) te o tipu PAT koja se koristi (Singh i sur., 2017).

Visokoenergetske metode uključuju mehaničke uređaje koji proizvode silu potrebnu za razaranje vodene i uljne faze na kapljice nanometarskih dimenzija (Singh i sur., 2017). Prije početka primjene visokoenergetske metode potrebno je pomiješati pripremljenu uljnu i vodenu fazu na miješalici pri velikim brzinama okretaja čime nastaje gruba emulzija (Jurišić Dukovski, 2021). Uređaji koji se koriste u sljedećem koraku izrade (mikrofluidizatori, visokotlačni homogenizatori i ultrasonikatori) razlikuju se u temeljnom principu rada. Prednost visokoenergetskih metoda temelji se na većoj slobodi pri izboru formulacijskih parametara te mogućnošću uvećanja procesa izrade na industrijsko mjerilo (Jurišić Dukovski, 2021). Nedostatak visokoenergetskih metoda je visoka cijena uređaja i zagrijavanje formulacije tijekom samog procesa obrade, što zahtijeva uvođenje hlađenja u slučaju korištenja termolabilnih tvari.

Niskoenergetske metode najčešće uključuju metodu spontanog emulgiranja i metodu inverzije faza. Ključna karakteristika ovih metoda je korištenje kemijske energije pohranjene u pomoćnim tvarima formulacije za stvaranje kapljica vrlo malih prosječnih veličina. Međutim, izbor ulja i PAT prikladnih za izradu nanoemulzija ovim metodama vrlo je ograničen, a mogućnosti uvećanja navedenih metoda na industrijsko mjerilo još su uvijek nedovoljno istražene (Singh i sur., 2017).

### **1.3.3. Stabilnost nanoemulzija**

Baš poput klasičnih makroemulzija, nanoemulzije su termodinamički nestabilni sustavi jer je potrebno uložiti energiju za njihov nastanak. Ipak, rezultat pripreve nanoemulzija nakon utroška velike količine energije jesu kapljice nanometarskih dimenzija. Time se kod nanoemulzija osiguravaju usporeni procesi destabilizacije, što ih razlikuje od klasičnih makroemulzija (Jurišić Dukovski, 2021). Nakon izvjesnog vremena, nanoemulzije će se raspasti zbog djelovanja različitih destabilizacijskih mehanizama: Ostwaldovog zrenja, flokulacije, vrhnjenja ili sedimentacije i koalescencije od kojih je najznačajnije Ostwaldovo zrenje. Pojam „mikroemulzije“ često se u literaturi neispravno koristi umjesto pojma „nanoemulzije“ (i obrnuto), što je vjerojatno posljedica sličnosti formulacijskih te makroskopskih i molekularnih

aspekata nanoemulzija i mikroemulzija (Anton i Vandamme, 2011). Međutim, mikroemulzije sadrže veće udjele PAT (10-40 %), čime je omogućen njihov spontani nastanak, odnosno termodinamička stabilnost (Hegde i sur., 2013). Termodinamička stabilnost mikroemulzija znači da su one osjetljive na promjenu temperature i sastava, stoga razrjeđivanje mikroemulzija vodom dovodi do promjene veličina kapljica te u konačnici do njihovog raspada. Za razliku od toga, kinetički stabilne nanoemulzije moguće je razrjeđivati vodom bez utjecaja na veličinu kapljica i stabilnost. Mogućnost razrjeđivanja nanoemulzija vodom važno je svojstvo kod pripreme nanoemulzija za oftalmičku ili parenteralnu primjenu prilikom kojih će doći do razrjeđivanja formulacije suzama ili plazmom. Još jedna značajna razlika između mikroemulzija i nanoemulzija se očituje u tome što redoslijed dodavanja sastojaka ni na koji način ne utječe na konačan izgled i svojstva mikroemulzija, dok je redoslijed dodavanja sastojaka presudan za izradu kinetički stabilnih nanoemulzija. (Anton i Vandamme, 2011; Jurišić Dukovski, 2021).

#### **1.4. *In situ* gelirajući oftalmički sustavi**

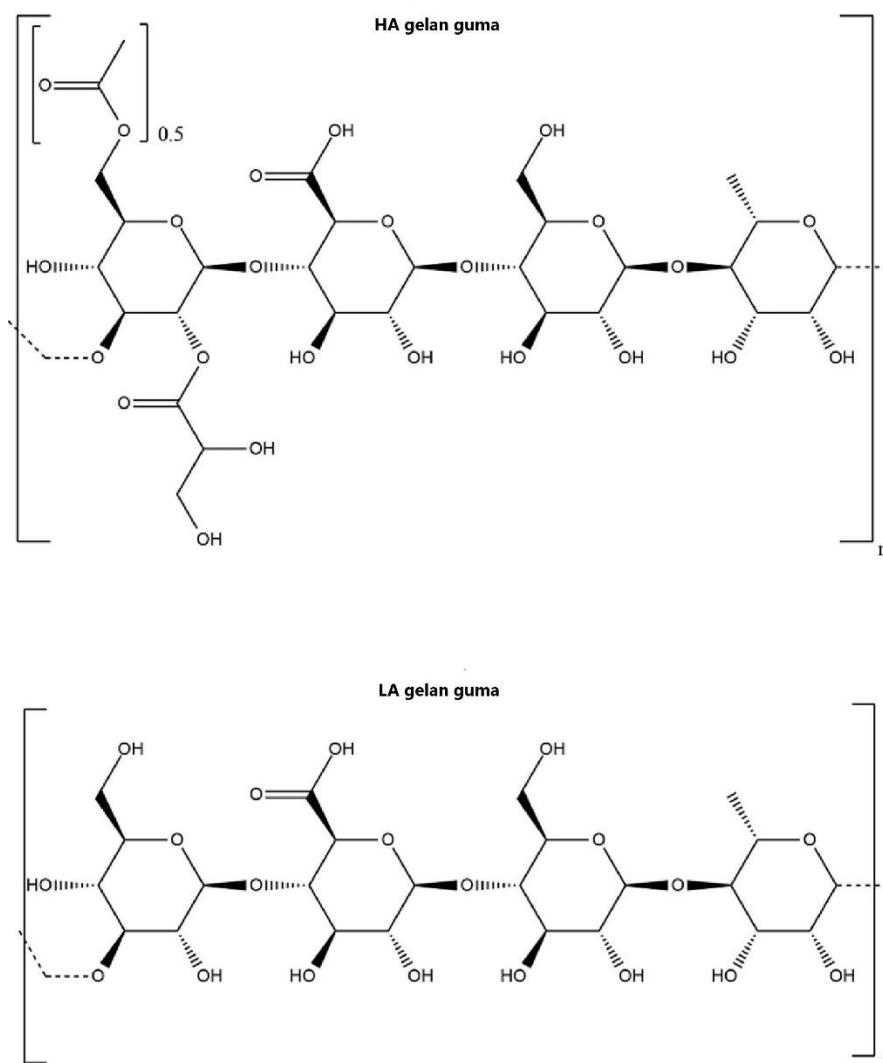
*In situ* gelirajući sustavi jedni su od inovativnih tehnoloških platformi za dostavu djelatnih tvari na površinu oka (Destruel i sur., 2020). To su viskozne tekućine koje, izložene određenim fiziološkim uvjetima na površini oka, prelaze u gel omogućujući produženo vrijeme zadržavanja pripravka. Fazni prijelaz u gel potaknut je temperaturom, pH vrijednošću ili ionskim sastavom mjesta primjene. Pomoćne tvari koje omogućuju fazni prijelaz su različiti polimeri osjetljivi na promjenu temperature (npr. poloksameri), promjenu pH (npr. karbomer) ili polimeri osjetljivi na prisutnost određenih elektrolita (npr. gelan guma, alginati) (Almeida i sur., 2014).

*In situ* gelirajući sustavi predstavljaju vrlo prikladan i unosan pristup isporuci lijekova povezujući konvencionalan i moderan način oftalmičke primjene. Ukapavanje formulacije u tekućem obliku (u obliku kapi za oko) omogućuje pacijentu jednostavnu, sigurnu i reproducibilnu primjenu. Štoviše, priprema i proizvodnja sterilnih tekućih formulacija na industrijskoj razini jednostavnija je u usporedbi s čvrstim i polučvrstim oblicima (Agrawal i sur., 2012).

## 1.5. Gelan guma

Gelan guma je linearni, anionski heteropolisaharid čiju okosnicu čine međusobno povezane  $\beta$ -D-glukoza,  $\beta$ -D-glukuronska kiselina i  $\alpha$ -L-ramnoza u molarnom omjeru 2 : 1 : 1 stvarajući tako tetrasaharidnu ponavljajuću jedinicu. Izlučuje ju mikroorganizam *Sphingomonas elodea*, a unatoč svom mikrobnom podrijetlu gelan guma je sigurna i učinkovita što rezultira njenom raširenom primjenom u različitim industrijama. Prikladna je za oftalmičku primjenu zahvaljujući svojoj netoksičnosti, neiritabilnosti, mogućnosti jednostavne primjene i reološkim karakteristikama (Bhalerao i sur., 2019; Oliveira i sur., 2010). O prikladnosti gelan gume kao pomoćne tvari za oftalmičku primjenu govori i činjenica da na tržištu već postoje odobrene kapi za oko s gelan gumom. Timoptic-XE<sup>®</sup> su kapi za oko u obliku otopine s timololmaleatom koje sadrže gelan gumu, a koriste se za liječenje povišenog očnog tlaka (Almeida i sur., 2014). Gelan guma se također koristi i kao pomoćna tvar u istraživanju i razvoju inovativnih oftalmičkih sustava za dostavu djelatnih tvari, poput kapi za oko s terbinafin hidrokloridom u obliku nanoemulzije s gelan gumom za liječenje gljivičnog keratitisa (Tayel i sur., 2013). Postoje dva tipa gelan gume: nativna, visokoacilirana (HA, engl. *high acyl*) gelan guma i deacilirana (LA, engl. *low acyl*) gelan guma. Glavna razlika je u dvije acilne skupine koje su kod HA gelan gume vezane za isti glukozni ostatak tetrasaharidne ponavljajuće jedinice: O-2-glicerilna i O-5-acetilna skupina (BeMiller, 2019). Struktura HA i LA gelan gume prikazana je slikom 2. Prilikom komercijalne proizvodnje, nativna gelan guma se izlaže alkalnom mediju pri visokoj temperaturi što rezultira deacilacijom i stvaranjem LA gelan gume (Morris i sur., 2012). Deacilacija gelan gume ima značajan utjecaj na reološka svojstva nastalih gelova (BeMiller, 2019). LA gelan guma stvara čvrste gelove, dok su za HA gelan gumu karakteristični mekani i elastični gelovi. Uzrok različitih svojstava stvorenih gelova proizlazi iz strukture gelan gume iz kojih nastaju. Prisutnost acilnih skupina kod HA gelan gume ograničava agregaciju uzvojnica i rezultira stvaranjem mekanih gelova; uklanjanjem acilnih skupina (LA gelan guma) omogućena je agregacija dvostrukih uzvojnica i stvaranje čvrstih gelova (Sworn, 2009). Fazni prijelaz gelan gume iz tekućine u gel potaknut je prisutnošću različitih kationa (Almeida i sur., 2014).



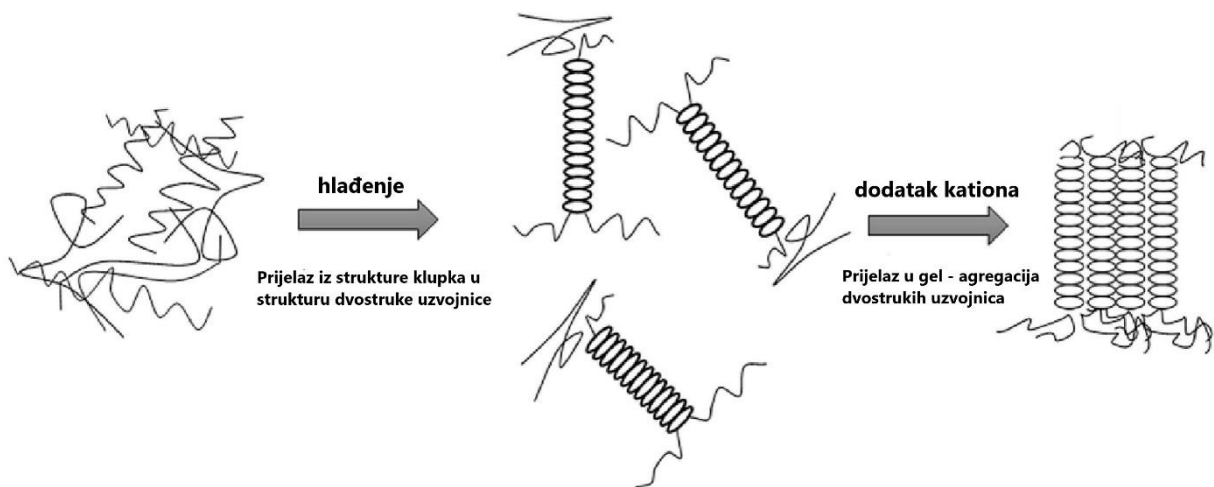


**Slika 2.** Struktura HA i LA gelan gume (preuzeto i prilagođeno prema Gomes i sur., 2023)

Mehanizam geliranja je proces koji obuhvaća nekoliko koraka tijekom kojih molekule gelan gume prelaze iz nasumično zavijene strukture klupka (engl. *coil*) u uređenu strukturu dvostruke uzvojnice (engl. *double helix*). Prvi korak je otapanje polimera u otopini zagrijanoj na oko 80°C, nakon čega je polimer u nasumičnom obliku klupka. Slijedi proces hlađenja otopine te stvaranja van der Waalsovih sila i vodikovih veza unutar nasumičnog klupka, pri čemu se događa reverzibilni prijelaz strukture klupka u strukturu dvostruke uzvojnice (engl. *coil to helix transition*) (Oliveira i sur., 2010; Gomes i sur., 2023). Međutim, kod nižih koncentracija gelan gume formiranje uređene strukture heliksa ne rezultira nužno nastajanjem gela jer ne dolazi do dostatne interakcije između otopljenih molekula gelan gume i stvaranja kontinuirane

trodimenzionalne mreže, a glavni uzrok tome su bočne negativno nabijene karboksilne skupine između kojih dolazi do elektrostatskih odbijanja (Oliveira i sur., 2010). Prisutnost kationa omogućuje smanjenje elektrostatskih odbijanja i omogućuje agregaciju dvostrukih uzvojnica u stabilnu, mrežastu strukturu gela (Gomes i sur., 2023). Slika 3. prikazuje proces geliranja gelan gume.

Elektroliti suzne tekućine, posebno  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , prikladni su za geliranje gelan gume. Interakcije kationa prisutnih u suznoj tekućini i negativno nabijenih polisaharida potiče umrežavanje strukture čime se poboljšava vrijeme zadržavanja i biorasploživost formulacija za oftalmičku primjenu (Almeida i sur., 2014). Svojstva geliranja ovise i o vrsti kationa u čijoj prisutnosti nastaju gelovi; dvovalentni kationi učinkovitije potiču geliranje gelan gume u odnosu na monovalentne katione. Geliranje u prisutnosti monovalentnih kationa rezultat je smanjenja elektrostatskih odbijanja između ioniziranih karboksilnih skupina gelan gume, jednako kao i u prisutnosti dvovalentnih kationa. Razlog učinkovitijeg geliranja dvovalentnim kationima je stvaranje kemijskih veza između kationa i dvije karboksilne skupine gelan gume koje pripadaju glukuronskoj kiselini (Oliveira i sur., 2010).



**Slika 3.** Mehanizam geliranja gelan gume (preuzeto i prilagođeno prema Gomes i sur., 2023.)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U suvremenom društvu, bolest suhog oka predstavlja sve veći zdravstveni izazov što zahtijeva temeljitije razumijevanje uzroka, mehanizama nastanka bolesti i terapijskih strategija. Rastući problem bolesti suhog oka može se pripisati brojnim čimbenicima, uključujući povećanu uporabu digitalnih uređaja, okolišne čimbenike i starenje populacije. Oko je, anatomski i fiziološki, jedinstven i kompleksan organ zbog čega je postizanje zadovoljavajuće biorasploživosti topikalnih farmaceutskih oblika složen izazov. Suzenje oka, treptanje i nazolakrimalna drenaža su učinkoviti obrambeni mehanizmi koji štite oko od stranih čestica, ali istovremeno predstavljaju fiziološka ograničenja za konvencionalne oblike kapi za oko kao što su otopine ili suspenzije (Almeida i sur., 2014).

Nanoemulzije su terapijski sustavi koji predstavljaju napredak u liječenju bolesti suhog oka budući da omogućuju produljeno zadržavanje na površini oka zbog interakcije uljne faze s lipidnim slojem suznog filma te učinkovito stabiliziraju suzni film čija je homeostaza narušena kod bolesti suhog oka.

*In situ* gelirajući oftalmički sustavi omogućuju produljeno vrijeme zadržavanja pripravka na mjestu primjene zahvaljujući karakterističnom sol-gel faznom prijelazu. Fazni prijelaz iz tekućine u gel može biti potaknut temperaturom, pH-vrijednošću i prisutnošću određenih elektrolita na mjestu primjene. Ključna prednost takvih sustava kao oblika za oftalmičku primjenu je upravo precizno i jednostavno doziranje zahvaljujući tekućoj konzistenciji formulacije te produljeno zadržavanje na mjestu primjene korištenjem intrinzičnih svojstava površine oka kao poticaja za fazni prijelaz tekuće formulacije u gel (Destruel i sur., 2020).

Gelan guma je vrsta polimera čiji je fazni prijelaz u gel potaknut prisutnošću različitih elektrolita. Interakcija kationa prisutnih u suznoj tekućini ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) s negativno nabijenim skupinama polisaharida rezultira stvaranjem kontinuirane mrežaste strukture gela koja omogućuje produljeno zadržavanje formulacije na površini oka i, posljedično, veću biorasploživost primijenjene djelatne tvari (Gomes i sur., 2023).

Spoj nanoemulzije s *in situ* gelirajućim sustavom predstavlja inovativni formulacijski pristup u kojem su sjedinjene prednosti nanoemulzije (nadoknada svih komponenata suznog filma) i gela (produljeno zadržavanje na površini oka), a istovremeno je izbjegnuta nereproducibilnost doziranja gelova.

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije s gelan gumom kao gelirajućim polimerom i ispitati njihova fizikalno-kemijska i reološka svojstva, kao i njihovu stabilnost.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada bili su:

- pripremiti *in situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije s različitim koncentracijama gelan gume koristeći visokoenergetsku metodu mikrofluidizacije
- odrediti fizikalno-kemijska svojstva nanoemulzija uključujući veličinu kapljica, indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) zeta potencijal, pH i osmolalnost
- ispitati reološka svojstva nanoemulzija s različitim koncentracijama gelan gume
- ispitati stabilnost pripremljenih nanoemulzija nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

Prilikom izrade nanoemulzija korišteni su Miglyol 812 (Fagron Hrvatska d.o.o., D. Zelina, Hrvatska), Lecitin S45 (Lipoid, Ludwigshafen, Njemačka), Kolliphor EL (BASF, Ludwigshafen, Njemačka), glicerol (Fagron Hrvatska d.o.o., D. Zelina, Hrvatska), Phytigel – gelan guma (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Taufkirchen, Njemačka) i pročišćena voda.

Za izradu 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 (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), urea (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalcijev klorid (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), natrijev karbonat (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), kalijev hidrogenkarbonat (BDH Prolabo, Manchester, Ujedinjeno Kraljevstvo), natrijev hidrogenfosfat dihidrat (Fluka Chemie AG, Buchs, Švicarska), klorovodična kiselina (10 M; Panreac Química S.A.U., Barcelona, Španjolska) i pročišćena voda.

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprava nanoemulzija

Priprava nanoemulzija sastoji se od nekoliko koraka. Prvi korak je priprema uljne faze koja se sastoji od otapanja lecitina S45 u Miglyol-u 812 korištenjem magnetske miješalice (2 mag MIX 15 eco AG, München, Njemačka), pri 700 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm) na sobnoj temperaturi. Zbog dugotrajnosti postupka otapanja, uljna je faza ostavljena na miješalici do idućeg dana. Nakon pripreme uljne faze pripremljena je 1%-tna vodena otopina gelan gume otapanjem odgovarajuće količine gelan gume u pročišćenoj vodi, uz miješanje pri 900 rpm na magnetskoj miješalici, pri temperaturi od 85°C tijekom 20 minuta. Uslijedilo je otapanje Kolliphora EL i glicerola u pročišćenoj vodi, a zatim je u otopinu dodana i određena količina 1%-tne otopine gelan gume, kako bi konačni udio gelan gume u formulacijama iznosio 0,05%, 0,1%, 0,2% i 0,4% (*m/m*). Tako pripravljena vodena faza zatim je izmiješana na magnetskoj miješalici pri 700 rpm 10 minuta. Na kraju je uljna faza dodana u vodenu fazu, a

zatim su formulacije izmiješane na magnetskoj miješalici pri 900 rpm tijekom 10 minuta. Točan sastav formulacija prikazan je u Tablici 1. Sve formulacije su rađene u duplikatu. Idući korak bio je miješanje pomoću visokoturažne miješalice (T18 digital Ultra Turrax<sup>®</sup>, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co, Njemačka) u trajanju od 5 minuta pri 15000 rpm. Posljednji korak je obrada dobivenih mliječno bijelih grubih emulzija na mikrofluidizatoru (LM20 Microfluidizer<sup>®</sup>, Microfluidics, Newton Massachusetts, SAD) pri 1000 bara, u 10 ciklusa. Time završava priprema homogenih nanoemulzija.

**Tablica 1.** Sastav izrađenih nanoemulzija

Formulacija	Miglyol 812 (%, m/m)	Lecitin S45 (%, m/m)	Kolliphor EL (%, m/m)	Glicerol (%, m/m)	Pročišćena voda (%, m/m)	Gelan guma (%, m/m)
N	2,5	0,05	0,25	2,5	94,70	0,00
NG1	2,5	0,05	0,25	2,5	94,65	0,05
NG2	2,5	0,05	0,25	2,5	94,60	0,10
NG3	2,5	0,05	0,25	2,5	94,50	0,20
NG4	2,5	0,05	0,25	2,5	94,30	0,40

### 3.2.2. Ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstava nanoemulzija

#### 3.2.2.1. Mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti

Nanoemulzije su prije mjerenja veličine kapljica i indeksa polidisperznosti razrijeđene pročišćenom vodom prethodno filtriranom kroz membranski filter od polietersulfona, veličine pora 0,45 µm (Chromafil<sup>®</sup> Xtra PES-45/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Za mjerenje veličine kapljica i indeksa polidisperznosti korišten je uređaj Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) koji djeluje na principu tehnike dinamičkog raspršivanja svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS). Mjerenja su provedena pri 25°C i kutu detekcije od 174,7°, korištenjem jednokratnih kiveta od polistirena dimenzija 10×10×45 mm (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Njemačka). Mjerenja su rađena u triplikatu.

### **3.2.2.2. Mjerenje zeta potencijala**

Zeta potencijal nanoemulzija izmjeren je na uređaju Zetasizer Ultra pri 25°C. Prije mjerenja zeta potencijala uzorci nanoemulzija su razrijeđeni pročišćenom vodom prethodno filtriranom kroz membranski filter od polietersulfona, veličine pora 0,45 µm (Chromafil® Xtra PES-45/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Posebne kivete za mjerenje zeta potencijala, Folded Capillary Zeta Cell, DTS1070 (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo), prije mjerenja su isprane etanolom, a potom i pročišćenom vodom. Mjerenja su rađena u triplikatu.

### **3.2.2.3. Mjerenje pH vrijednosti**

Mjerenje pH vrijednosti nanoemulzija je provedeno pomoću uređaja Seven Multi pH/conductometer (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD) pri 25°C, izravnim uranjanjem pH elektrode u mjerenu formulaciju. Prije početka mjerenja, uređaj je kalibriran uranjanjem elektrode u 3 otopine pufera različitih pH vrijednosti. Elektroda je isprana destiliranom vodom nakon kalibracije te se nakon toga pristupilo mjerenju pH vrijednosti pripremljenih nanoemulzija.

### **3.2.2.4. Mjerenje osmolalnosti**

Osmolalnost nanoemulzija izmjerena je metodom sniženja temperature ledišta pomoću uređaja OsmoTECH® Single-Sample Micro-Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, Massachusetts, SAD).

### **3.2.3. Mjerenje viskoznosti nanoemulzija**

Viskoznost nanoemulzija izmjerena je rotacijskim testom pomoću uređaja Modular Compact Rheometer (MCR) 102 (Anton Paar, Graz, Austrija) koji je spojen s osobnim računalom, a podaci su obrađeni i analizirani preko RheoCompass™ softvera. Korišteno gornje mjerno tijelo uređaja je stožac-ploča (engl. *cone-plate*) CP 50-1, promjera 50 mm i nagiba 1°. Uvjeti pod kojima je mjerenje provedeno su: raspon brzina smicanja 1-100 s<sup>-1</sup>, udaljenost između gornjeg i donjeg mjernog tijela 0,102 mm, temperatura mjerenja 25°C i vrijeme proteklo između

stavljanja uzorka na donje mjerno tijelo i spuštanja mjernog tijela u mjerni položaj te početka mjerenja 60 s.

#### **3.2.4. Mjerenje viskoznosti nanoemulzija nakon miješanja s umjetnom suznom tekućinom**

ATS je pripremljen otapanjem soli, glukoze i ureje u pročišćenoj vodi (Lorentz, 2011), a točan sastav je prikazan u Tablici 2. ATS-u je pomoću pH-metra (Seven Multi pH/conducto-meter, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD) izmjeren pH 6,5. Uslijedilo je termostatiranje umjetne suzne tekućine pri 34°C u orbitalnoj tresilici (Environmental Shaker – Incubator ES-20/60, Biosan, Latvia), uz miješanje brzinom od 350 rpm. Ukupni volumen pojedinog uzorka nanoemulzije pomiješane s ATS-om iznosio je 4,0 ml: 3,125 ml nanoemulzije i 0,875 ml ATS-a. Kako omjer prosječnog volumena kapi za oko i prosječnog volumena suznog filma iznosi 25:7 (Carlfors i sur., 1998) tako su uzorci nanoemulzija i umjetne suzne tekućine pomiješani u navedenom volumnom omjeru na način da je uzorak nanoemulzije sobne temperature (uobičajena temperatura čuvanja kapi za oko) dodan u odgovarajući volumen ATS-a zagrijanog na 34 °C (prosječna temperatura površine oka) (Gugleva i sur., 2020). Nakon toga smjesa je ostavljena 1 minutu u inkubatoru (34 °C, 350 rpm, zatim je provedeno mjerenje viskoznosti rotacijskim testom na reometru. Korišteno gornje mjerno tijelo uređaja je stožac-ploča (engl. *cone-plate*) CP 50-1, promjera 50 mm i nagiba 1°. Uvjeti pod kojima je mjerenje provedeno su: raspon brzina smicanja 1-100 s<sup>-1</sup>, udaljenost između gornjeg i donjeg mjernog tijela 0,102 mm, temperatura mjerenja 34°C i vrijeme proteklo između stavljanja uzorka na donje mjerno tijelo i spuštanja mjernog tijela u mjerni položaj te početka mjerenja 60 s.



**Tablica 2.** Sastav umjetne suzne tekućine

Sastavnica	Koncentracija (g/L)
Natrijev klorid	5,26
Kalijev klorid	1,19
Natrijev citrat dihidrat	0,44
Glukoza, bezvodna	0,04
Urea	0,07
Kalcijev klorid	0,06
Natrijev karbonat	1,27
Kalijev hidrogenkarbonat	0,30
Natrijev hidrogenfosfat dihidrat	4,27
Klorovodična kiselina (37% = 10M)	0,44

### 3.2.5. Test promjene amplitude

Test promjene amplitude (engl. *Amplitude sweep test*) ubraja se u oscilacijske testove ovisnosti modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) ispitivane formulacije o smičnoj deformaciji (amplitudi) ([www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)). Mjerenje je provedeno nakon miješanja uzorka nanoemulzije s ATS-om u omjeru objašnjenom u poglavlju 3.2.4. Korišteno gornje mjerno tijelo je PP50 (engl. *parallel plate*) promjera 50 mm, a njegova je udaljenost od donjeg mjernog tijela postavljena na 0,50 mm. Test je proveden na temperaturi od 34°C, pri rasponu amplituda od 0,1 do 100% i konstantnoj frekvenciji 10 s<sup>-1</sup>. Cilj ovog testa je utvrditi dolazi li do geliranja uzorka nanoemulzije nakon miješanja s ATS-om.

### 3.2.6. Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija

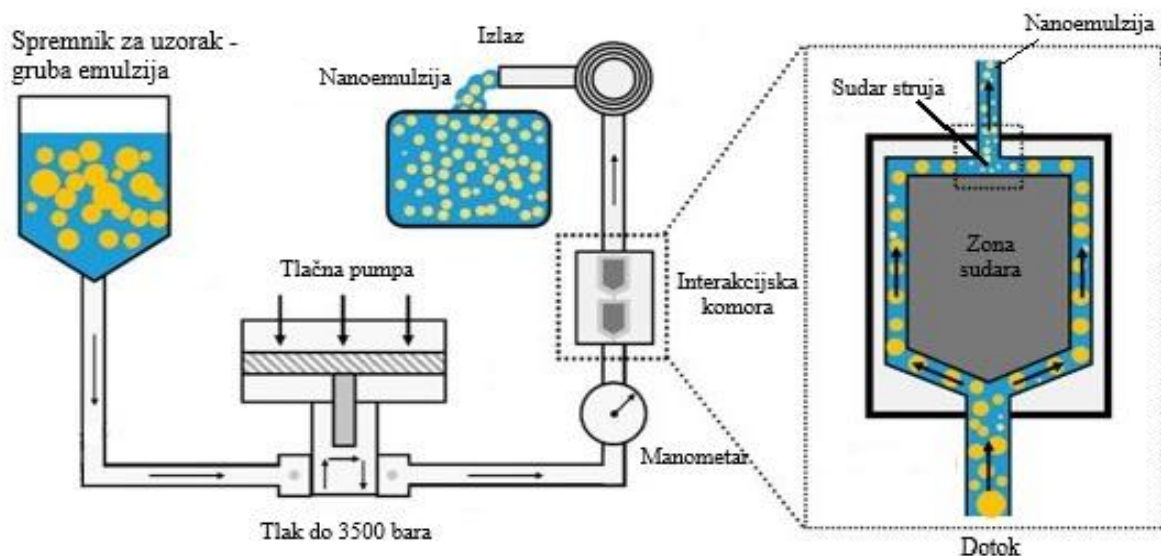
U svrhu ispitivanja stabilnosti pripremljenim nanoemulzijama su ponovno izmjerene veličine kapljica, indeks polidisperznosti, zeta potencijal i pH vrijednost 14 dana nakon njihove izrade i čuvanja pri sobnoj temperaturi.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Priprema i karakterizacija *in situ* gelirajućih oftalmičkih nanoemulzija

U ovom diplomskom radu za izradu nanoemulzija korištene su sljedeće pomoćne tvari: pročišćena voda kao vodena faza, Miglyol 812® (smjesa srednjelančanih triglicerida) kao uljna faza, lecitin (smjesa fosfolipida i slobodnih masnih kiselina) kao negativno nabijena površinski aktivna tvar, Kolliphor EL® kao neionska površinski aktivna tvar, glicerol kao sredstvo za izotonizaciju te gelan guma kao polimer koji djeluje kao reološki modifikator nanoemulzija.

Nanoemulzije su pripravljene visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije čemu je prethodilo stvaranje grubih emulzija miješanjem uljne i vodene faze pomoću visokoturažne miješalice. Mikrofluidizacija je postupak koji uključuje dovođenje grube emulzije u interakcijsku komoru mikrofluidizatora gdje se emulzija dijeli na dva različita protoka koji se međusobno sudaraju velikom brzinom. Kao rezultat sudara dvaju protoka, stvaraju se različite razorne sile (smično naprezanje, kavitacija) koje su iznimno učinkovite u stvaranju veličine kapljica karakterističnih za nanoemulzije (Uluata i sur., 2016). Veličina kapljica nanoemulzije ovisi o primijenjenom tlaku, broju prolaza kroz interakcijsku komoru (ciklusa) te sastavu formulacije (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Kombinacija ovih faktora omogućuje postizanje željene veličine kapljica i homogenosti nanoemulzija. Princip rada mikrofluidizatora prikazan je Slikom 4.



**Slika 4.** Princip rada mikrofluidizatora (preuzeto i prilagođeno prema Gawin-Mikołajewicz i sur. 2021)

Nakon mikrofluidizacije pripravljene nanoemulzije su mliječno-bijele boje i tekuće konzistencije. Nije primijećeno odvajanje faza. Uslijedila je fizikalno-kemijska karakterizacija dobivenih nanoemulzija uključujući mjerenje veličine kapljica, PDI, zeta potencijala, pH, osmolalnosti te viskoznosti. Rezultati mjerenja su prikazani u Tablici 3.

U ovom diplomskom radu prosječna veličina kapljica nanoemulzija mjerena je DLS tehnikom koja se temelji na Brownovom gibanju kapljica. Postupak obuhvaća osvjetljavanje uzorka laserom pri čemu se svjetlost raspršuje na kapljicama unutarnje faze nanoemulzije pod različitim kutovima, ovisno o dimenzijama kapljica. S obzirom na to da manje kapljice demonstriraju veću brzinu Brownovog gibanja u otopini, rezultirajuća fluktuacija intenziteta raspršene svjetlosti bit će veća u usporedbi s kapljicama većih dimenzija (Jurišić Dukovski, 2021). Razrjeđivanjem uzoraka smanjuju se moguće interferencije raspršene svjetlosti, kao i moguće interferencije pomoćnih tvari u formulaciji te se poboljšava reproducibilnost rezultata (Petrochenko i sur., 2018). Rezultati se prikazuju kao prosječna veličina kapljica (engl. *Z-Average*, *Z-Ave*) i PDI. PDI je mjera homogenosti disperzije, tj. mjera raspodjele veličina kapljica unutarnje faze oko srednje vrijednosti. PDI može imati vrijednost između 0 i 1, gdje 0 predstavlja potpuno monodisperzan sustav, a njegovim povećanjem i približavanjem vrijednosti 1 smanjuje se homogenost sustava (Petrochenko i sur., 2018). Prosječna veličina kapljica svih nanoemulzija s gelan gumom nalazi se u rasponu od 141,1 nm do 172,9 nm. Kao

što je prosječna veličina kapljica veća s većim udjelom gelan gume, tako i PDI raste od 0,108 do 0,222. Ipak, izmjerene PDI vrijednosti ukazuju na ujednačenost veličina kapljica izrađenih nanoemulzija. Za razliku od nanoemulzija s gelan gumom, kontrolna nanoemulzija bez gelan gume ima malo manju prosječnu veličinu kapljica (138,2 nm) te manju vrijednost PDI (0,079).

Zeta potencijal nanoemulzija mjeren je tehnikom elektroforetskog raspršivanja svjetlosti, koja je ujedno i najčešće korištena tehnika. Zeta potencijal se ne može mjeriti izravno, već se izvodi iz elektroforetske pokretljivosti nabijenih kapljica uzorka nanoemulzije preko Henryjeve jednadžbe. Primjenom električnog polja na uzorak nanoemulzije dolazi do gibanja nabijenih kapljica prema suprotno nabijenoj elektrodi brzinom ovisnom o naboju čestice. Što je veći naboj, jače su elektrostatske sile i, posljedično, veća je brzina gibanja kapljica prema elektrodi. Tehnika elektroforetskog raspršenja svjetlosti uključuje obasjavanje kapljica nanoemulzije u električnom polju laserom i mjerenje razlike frekvencija izvorne i raspršene zrake lasera koja je proporcionalna brzini kapljica (Bhattacharjee, 2016; Jurišić Dukovski, 2021). Rezultati mjerenja prikazani u Tablici 3 pokazali su da su vrijednosti zeta potencijala nanoemulzija s gelan gumom u rasponu od -33,0 do -44,9 mV što ukazuje na to da kapljice unutarnje faze na svojoj površini nose negativan naboj. Zeta potencijal kontrolne nanoemulzije bez gelan gume također je negativan (-29,1 mV). Ovakav je rezultat očekivan, s obzirom na to da je kao jedna od PAT korišten lecitin s velikim udjelom negativno nabijenih slobodnih masnih kiselina (Jurišić Dukovski, 2021). Međutim, primijećene su negativnije vrijednosti zeta potencijala kod nanoemulzija s većim udjelom gelan gume (formulacije NG3 i NG4), što ukazuje na moguću interakciju negativno nabijenih molekula gelan gume s površinom uljnih kapljica nanoemulzije. Također, rezultati zeta potencijala ukazuju i na to da su pripravljene formulacije stabilne. Sustavi s apsolutnom vrijednošću zeta potencijala od približno 60 mV smatraju se vrlo stabilnima, dok oni s apsolutnom vrijednošću između 20 i 30 mV imaju zadovoljavajuću stabilnost zahvaljujući elektrostatskim odbojnim silama između kapljica/čestica unutarnje faze (Rai i sur., 2018).

Određivanje pH-vrijednosti važan je aspekt u postizanju učinkovitih i stabilnih nanoemulzija čiji je iritacijski potencijal sveden na minimum na način da je pH formulacije u skladu s pH suznog filma koji je u rasponu od 6,8 do 8,2 (Jurišić Dukovski, 2021). Međutim, zahvaljujući velikom puferskom kapacitetu suza, zdravo oko može tolerirati formulacije širokog raspona pH, od 4 do 8 (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021). Točan utjecaj bolesti suhog oka na puferski kapacitet suza još nije utvrđen, no neka istraživanja ukazuju na pomak prema višim pH

vrijednostima suznog filma (Jurišić Dukovski, 2021). Nanoemulzijama s gelan gumom pripremljenim u sklopu ovog diplomskog rada izmjerene su pH vrijednosti od 6,06 do 6,18 (Tablica 3), što ukazuje na njihovu prikladnost za primjenu na oko. Kontrolnoj nanoemulziji bez gelan gume izmjerena je nešto viša pH vrijednost (6,68), stoga je moguće zaključiti da je dodatak gelan gume u formulaciju uzrokovao blagi pad pH vrijednosti. Pad pH vrijednosti vjerojatno je posljedica disocijacije slobodnih karboksilnih skupina gelan gume ( $pK_a \sim 3,5$ ) (Cassanelli i sur., 2018).

Fiziološka osmolalnost suznog filma kreće se između 270 i 315 mOsm/kg, no oko podnosi puno širi raspon vrijednosti od fiziološkog (Willcox i sur., 2017). Prema Liu i sur., (2009), senzorni neuroni rožnice reagiraju na vrijednosti osmolalnosti veće od 450 mOsm/kg što znači da oftalmički pripravci koji imaju osmolalnost veću od 450 mOsm/kg mogu izazvati osjećaj nelagode kod pacijenta. Prema rezultatima mjerenja osmolalnosti prikazanim u Tablici 3, sve formulacije imaju osmolalnost prikladnu za oftalmičku primjenu ( $\sim 300$  mOsm/kg). Također, s obzirom na rastući udio gelan gume u formulacijama, zaključak koji proizlazi iz dobivenih rezultata je da sama gelan guma nema značajnu osmotsku aktivnost.

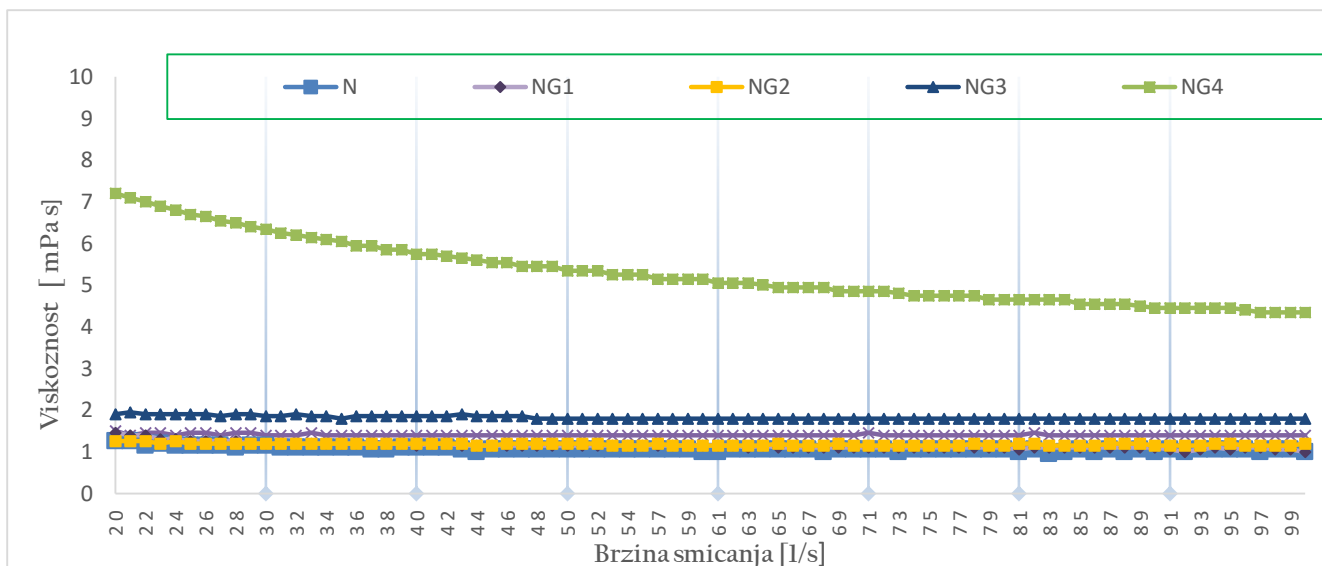
Viskoznost je mjera otpora tekućine tečenju – mjera unutarnjeg trenja tekućine i predstavlja važno svojstvo u funkcionalnosti i učinkovitosti formulacija za oftalmičku primjenu (Acharya i sur., 2018). Kod *in situ* gelirajućih nanoemulzija potrebno je postići dovoljno nisku viskoznost formulacije koja je prikladna za njihovo jednostavno ukapavanje u oko, ali i povećanje viskoznosti (nastajanje gela) neposredno nakon primjene koje će omogućiti produljeno vrijeme zadržavanja nanoemulzije na oku. Viskoznost pripremljenih formulacija u rasponu je vrijednosti od 1,1 do 7,1 mPas što je u skladu s fiziološkim vrijednostima viskoznosti suznog filma (1-9 mPas) (Jurišić Dukovski, 2021). Nadalje, viskoznost se povećava sukladno povećavanju koncentracije gelan gume u formulacijama što je u skladu s predviđanjima i rezultat je sve brojnijih interakcija polimernih lanaca u formulacijama s većim koncentracijama gelan gume (Salunke i Patil, 2016).

**Tablica 3.** Fizikalno-kemijska svojstva nanoemulzija s rastućim udjelom gelan gume (NG1-NG4) te kontrolne nanoemulzije bez gelan gume (N). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=2)

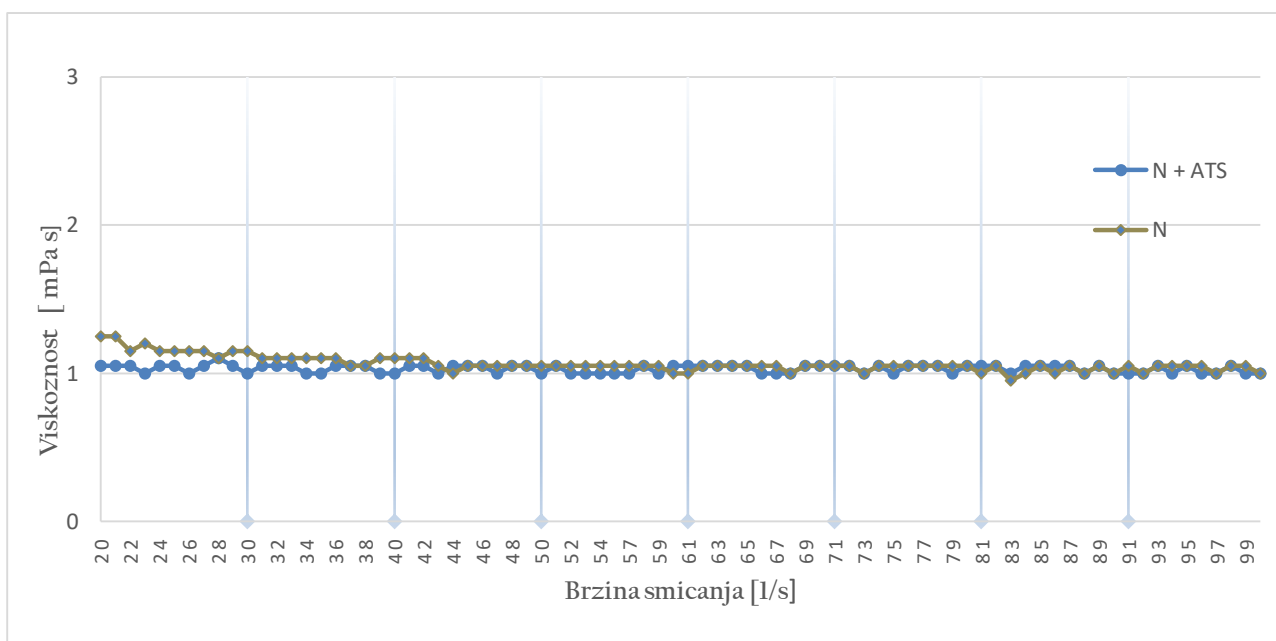
Formulacija	Udio gelan gume (% <i>m/m</i> )	Veličina kapljica (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)	pH	Osmolalnost (mOsm/kg)	Viskoznost (mPas)
<b>N</b>	0	138,2 $\pm$ 1,6	0,079 $\pm$ 0,018	-29,1 $\pm$ 0,8	6,68 $\pm$ 0,11	288,5 $\pm$ 4,5	1,1 $\pm$ 0,03
<b>NG1</b>	0,05	141,1 $\pm$ 1,6	0,108 $\pm$ 0,015	-33,0 $\pm$ 0,9	6,06 $\pm$ 0	301,5 $\pm$ 4,5	1,5 $\pm$ 0,02
<b>NG2</b>	0,1	141,0 $\pm$ 1,6	0,135 $\pm$ 0,016	-32,9 $\pm$ 0,9	6,10 $\pm$ 0	298 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 0,02
<b>NG3</b>	0,2	160,9 $\pm$ 4,5	0,216 $\pm$ 0,008	-44,0 $\pm$ 2,3	6,08 $\pm$ 0	299 $\pm$ 0	2,2 $\pm$ 0,03
<b>NG4</b>	0,4	172,9 $\pm$ 6,9	0,222 $\pm$ 0,033	-44,9 $\pm$ 1,2	6,18 $\pm$ 0	300 $\pm$ 1,4	7,1 $\pm$ 0,80

## 4.2. Krivulja viskoznosti nanoemulzija prije i nakon miješanja s umjetnom suznom tekućinom

Krivulje viskoznosti nanoemulzija su određene pri 25 °C (uobičajena temperatura čuvanja kapi za oko) pomoću rotacijskog testa na reometru i prikazuju ovisnost viskoznosti pojedinog uzorka o brzini smicanja. Newtonovi sustavi pokazuju linearnu ovisnost viskoznosti o brzini smicanja, dok kod ne-Newtonovih sustava ovisnost viskoznosti o brzini smicanja nije linearan. Razlikuju se plastični, pseudoplastični i dilatantni ne-Newtonovi sustavi (Acharya i sur., 2018). Slika 5 prikazuje krivulju viskoznosti svih formulacija prije miješanja s ATS-om na temelju čega zaključujemo da su formulacije s većim udjelima gelan gume viskoznije. Viskoznost kontrolne formulacije bez gelan gume (N) je približno 1 mPa·s, dok su viskoznosti NG1-NG4 formulacija u rasponu od 1,5 do 7,1 mPa·s što je prikladno za oftalmičku primjenu. Također, na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti da se kontrolna nanoemulzija N te nanoemulzije NG1, NG2 i NG3 ponašaju kao Newtonovi sustavi, dok se nanoemulzija NG4 s najvećim udjelom gelan gume ponaša kao ne-Newtonov pseudoplastični sustav. Pseudoplastično ponašanje vodenih otopina polimera poznato je iz literature te je poželjno svojstvo kapi za oko jer nakon primjene viskoznost pseudoplastične formulacije pada tijekom treptaja, što omogućuje nesmetano klizanje vjeđe po površini oka, dok između treptaja viskoznost formulacije raste, što omogućuje njezino produljeno zadržavanje na površini oka (Almeida i sur., 2014). Viskoznost formulacije NG4 pri brzini smicanja od 20 s<sup>-1</sup> bila je 7,2 mPa·s te se s povećanjem brzine smicanja do 100 s<sup>-1</sup> smanjila na 4,35 mPa·s. Slike 6, 7, 8, 9 i 10 prikazuju usporedbu ovisnosti viskoznosti nanoemulzija o brzini smicanja prije i nakon miješanja s ATS-om. Viskoznost nanoemulzija nakon miješanja s ATS-om mjerena je pri 34 °C jer je to prosječna temperatura površine oka (Gugleva i sur., 2020). Kod svih formulacija s gelan gumom (NG1-NG4) dolazi do blagog povećanja viskoznosti nakon miješanja s ATS-om (Slika 7-10). Za razliku od toga, kontrolna nanoemulzija N bez gelan gume nakon miješanja s ATS-om nije pokazala nikakvu promjenu u viskoznosti (Slika 6). Veće vrijednosti viskoznosti nakon miješanja s ATS-om su rezultat interakcija gelan gume s kationima prisutnim u ATS-u (Reed i sur., 2016).

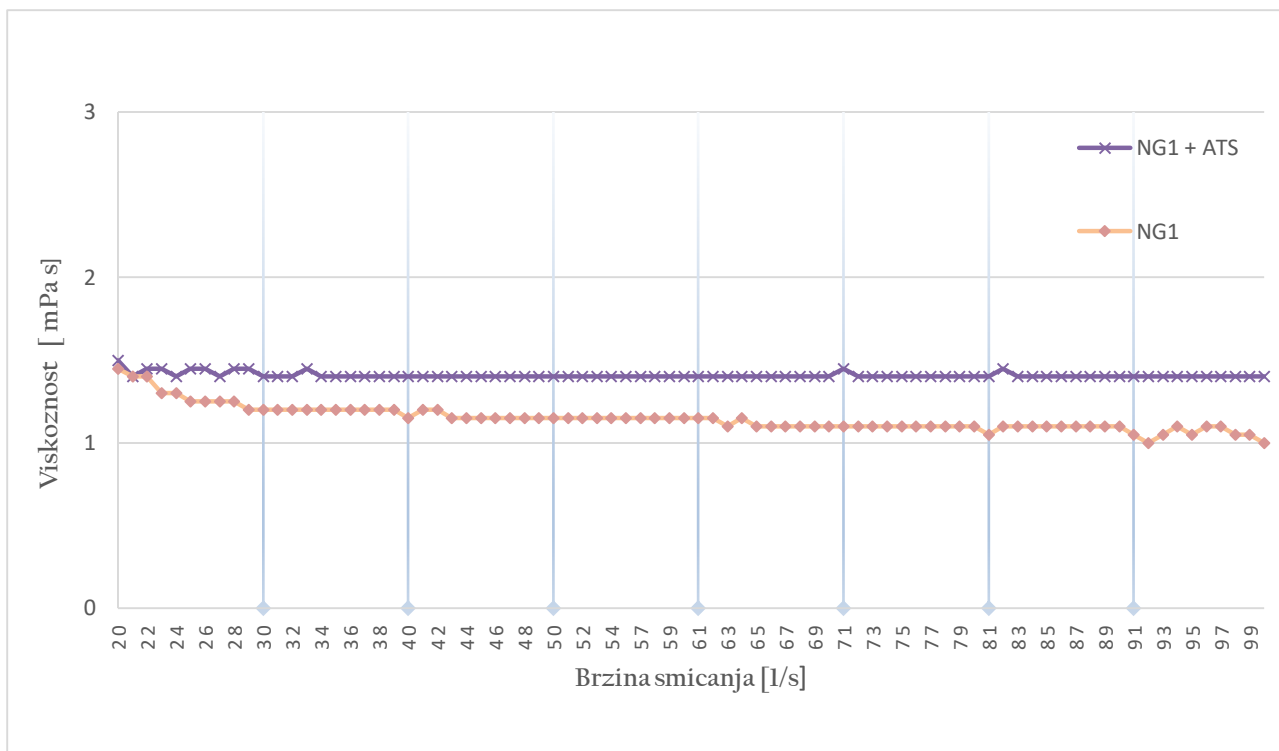


**Slika 5.** Krivulje viskoznosti kontrolne nanoemulzije bez gelan gume (N) i nanoemulzija s rastućim udjelom gelan gume (NG1-NG4). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.

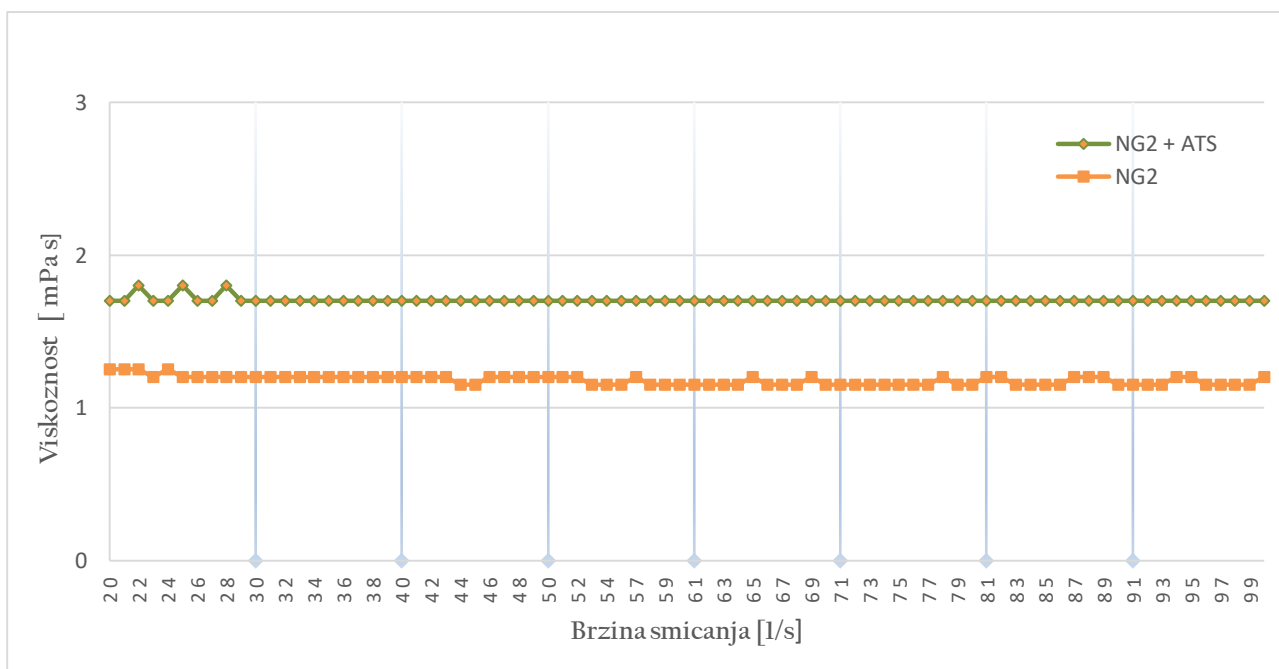


**Slika 6.** Krivulje viskoznosti kontrolne nanoemulzije bez gelan gume prije (N) i nakon miješanja s ATS-om (N+ATS). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.

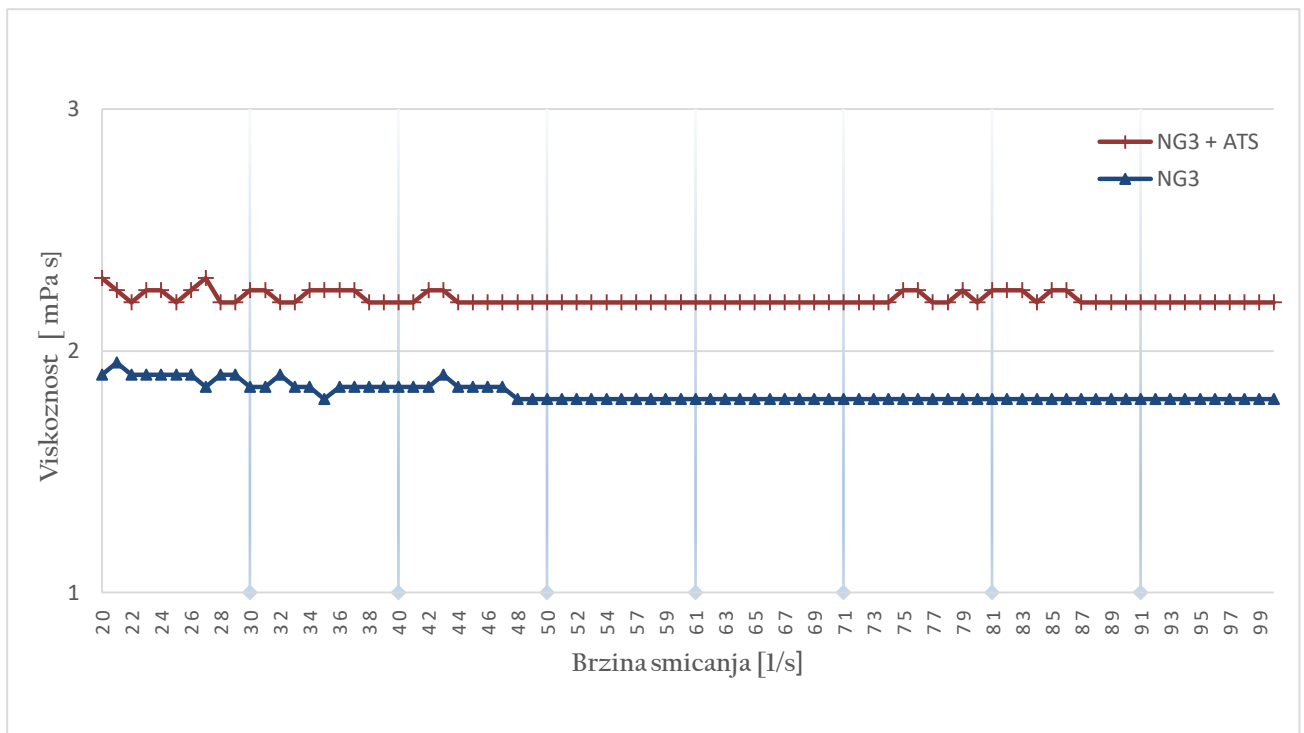




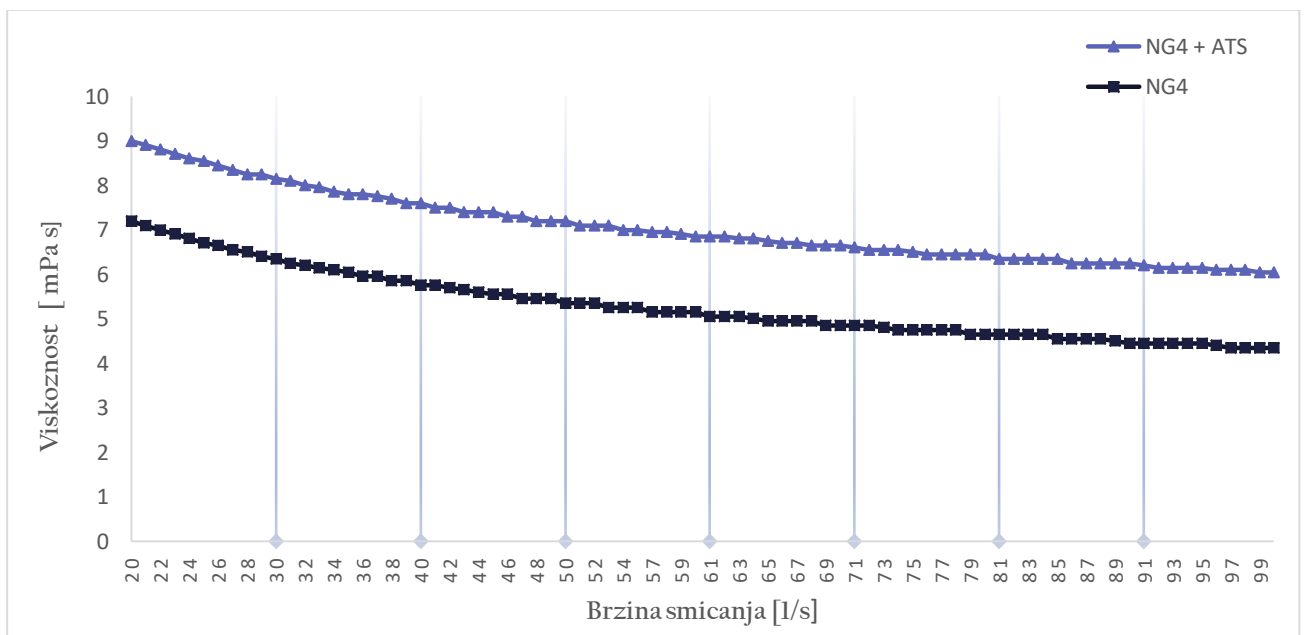
**Slika 7.** Krivulje viskoznosti nanoemulzije s najmanjim udjelom gelan gume (0,05%) prije (NG1) i nakon miješanja s ATS-om (NG1+ATS). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.



**Slika 8.** Krivulje viskoznosti nanoemulzije s 0,1% gelan gume prije (NG2) i nakon miješanja s ATS-om (NG2+ATS). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.



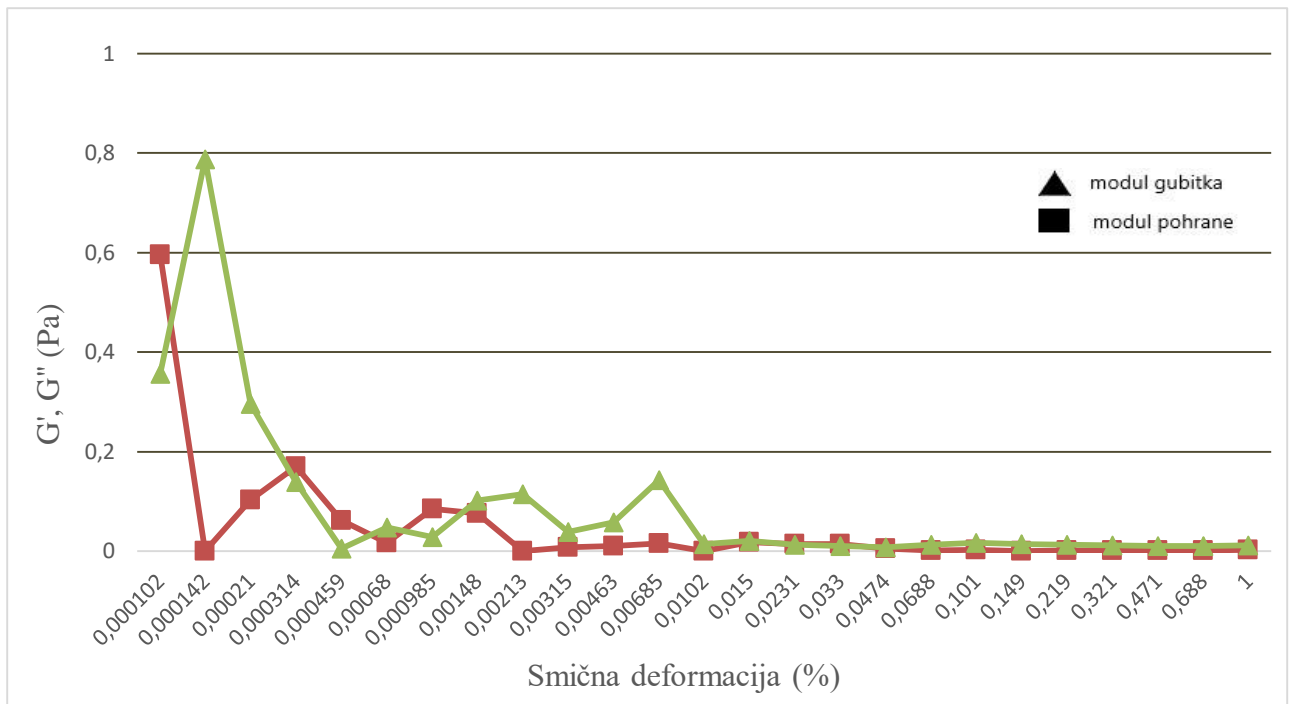
**Slika 9.** Krivulje viskoznosti nanoemulzije s 0,2% gelan gume prije (NG3) i nakon miješanja s ATS-om (NG3+ATS). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.



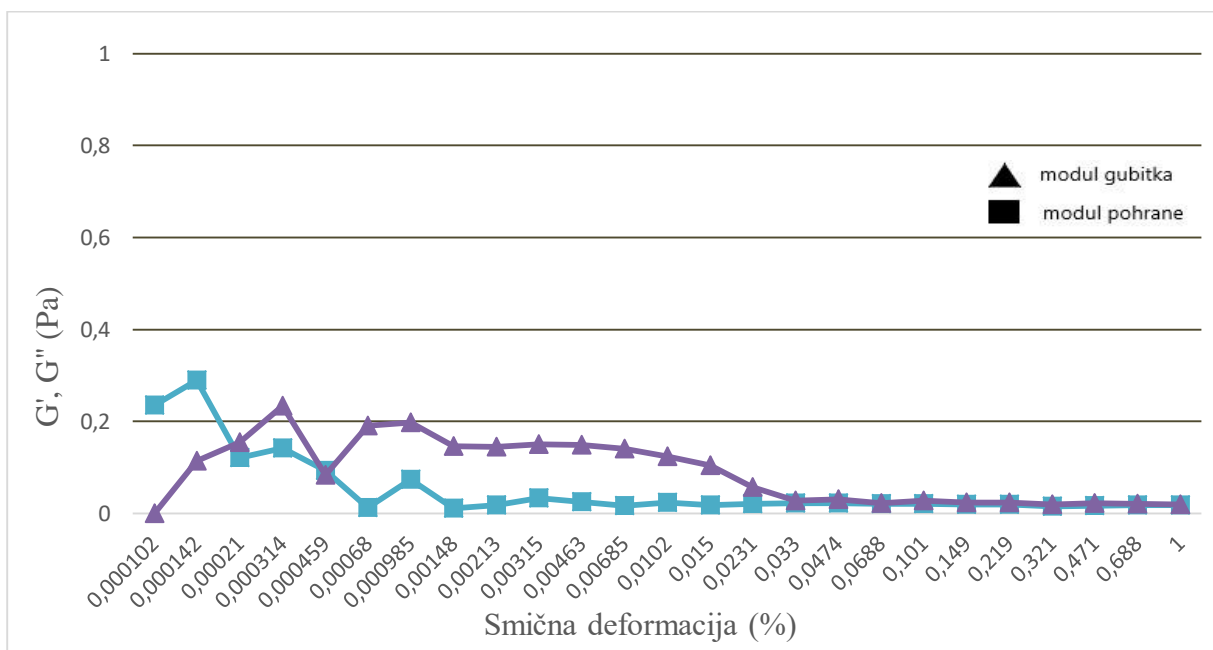
**Slika 10.** Krivulje viskoznosti nanoemulzije s najvećim udjelom gelan gume (0,4%) prije (NG4) i nakon miješanja s ATS-om (NG4+ATS). Sva mjerenja su provedena u duplikatu.

### 4.3. Test promjene amplitude

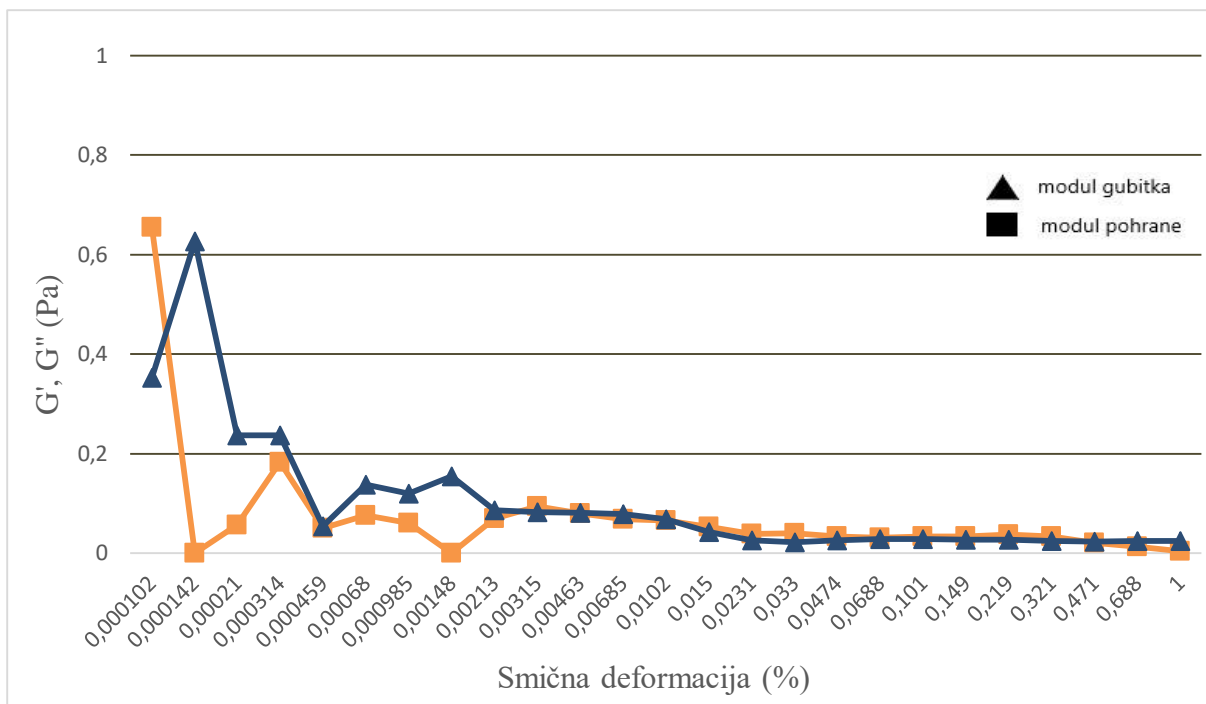
Test promjene amplitude ubraja se u oscilacijske testove kod kojeg je frekvencija konstantna, a sila djeluje oscilacijski na način da se naizmjenično primjenjuje i obustavlja smična sila na mjerno tijelo ([www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)). Rezultati testa promjene amplitude prikazuju se kao ovisnost modula pohrane i modula gubitka o smičnoj deformaciji (amplitudi). Za viskoelastične sustave, modul pohrane ( $G'$ ) predstavlja unutarnju energiju sustava koja se obnavlja nakon prestanka djelovanja sile na uzorak i čini elastičnu komponentu sustava. Modul gubitka ( $G''$ ) također predstavlja unutarnju energiju sustava, ali onu koja se pretvara u toplinsku energiju sustava koju uzorak apsorbira –  $G''$  predstavlja viskoznu komponentu sustava ([www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)). Ako je kod nekog uzorka vrijednost  $G'$  veća od vrijednosti  $G''$ , izraženiji je elastični karakter uzorka, stoga kažemo da se uzorak ponaša kao viskoelastična krutina. Suprotno tome, ukoliko je vrijednost  $G''$  veća od vrijednosti  $G'$ , kod uzorka prevladava viskozni karakter, stoga kažemo da se uzorak ponaša kao viskoelastična tekućina (Destruel i sur., 2020). Sukladno tome formulacije koje su pripravljene u sklopu ovog diplomskog rada su u stanju viskoelastične krutine, odnosno u stanju gela kada je nakon miješanja s ATS-om njihova vrijednost  $G'$  veća od vrijednosti  $G''$ . Slike 11, 12, 13, 14 i 15 prikazuju rezultate testa promjene amplitude pripremljenih formulacija nakon miješanja s ATS-om. Prema dobivenim rezultatima, kod kontrolne nanoemulzije bez gelan gume nije došlo do geliranja nakon miješanja s ATS-om (Slika 11). Također, kod nanoemulzija s nižim udjelima gelan gume (NG1 i NG2) nije došlo do stvaranja gela (Slika 12 i Slika 13), a razlog izostanka geliranja su preniske koncentracije gelan gume. Modul pohrane ( $G'$ ) veći je od modula gubitka ( $G''$ ) kod formulacija NG3 i NG4, tj. pri koncentracijama gelan gume 0,2 i 0,4% što znači da su uspješno gelirane nakon miješanja s ATS-om u fiziološki relevantnim uvjetima (Slika 14 i Slika 15). Udio gelan gume u NG3 i NG4 formulacijama je dostatan za stvaranje značajnih interakcija s kationima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) koji su prisutni u ATS-u što rezultira agregacijom dvostrukih uzvojnica gelan gume i nastankom gela. Monovalentni kationi prevladavaju u suznoj tekućini te su istraživanja pokazala da je uloga  $\text{Na}^+$  glavna u ostvarivanju interakcija s gelan gumom. Iako dvovalentni kationi ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) učinkovitije potiču geliranje gelan gume, njihov udio u suznoj tekućini je znatno manji od monovalentnih kationa zbog čega je njihova uloga sporedna (Reed i sur., 2016).



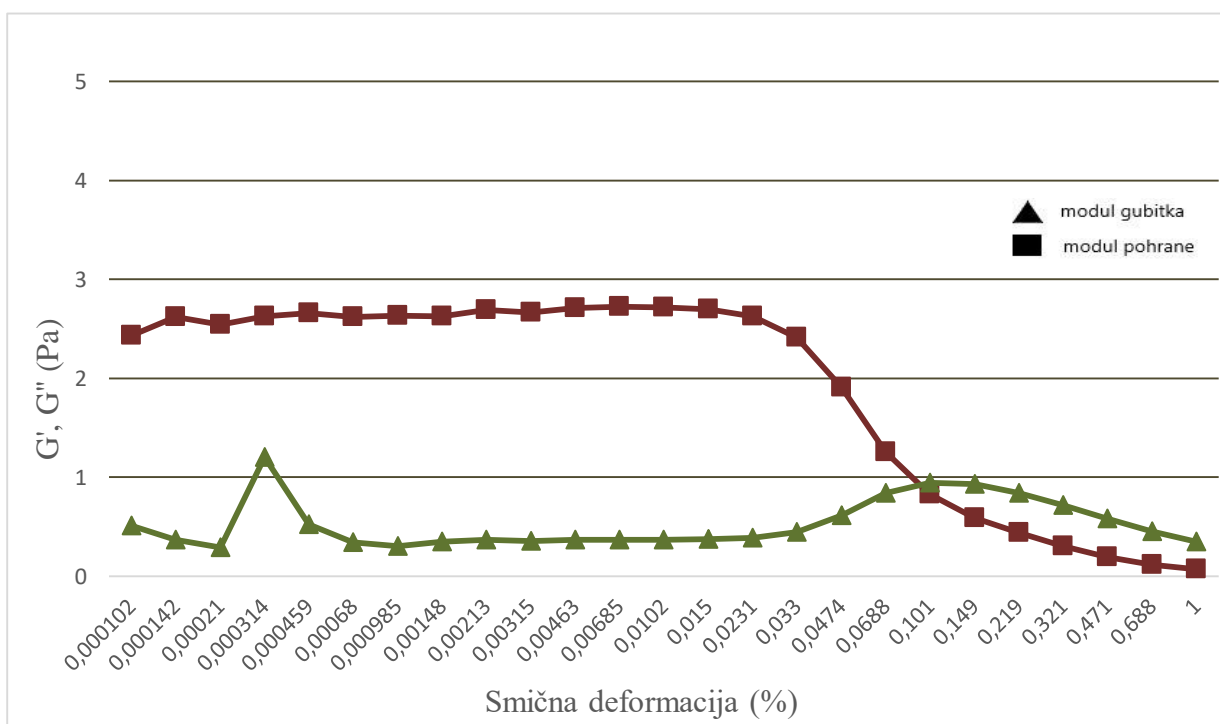
**Slika 11.** Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') kontrolne nanoemulzije (N) bez gelan gume o smičnoj deformaciji nakon miješanja s ATS-om pri temperaturi od 34°C. Mjerenja su provedena u duplikatu.



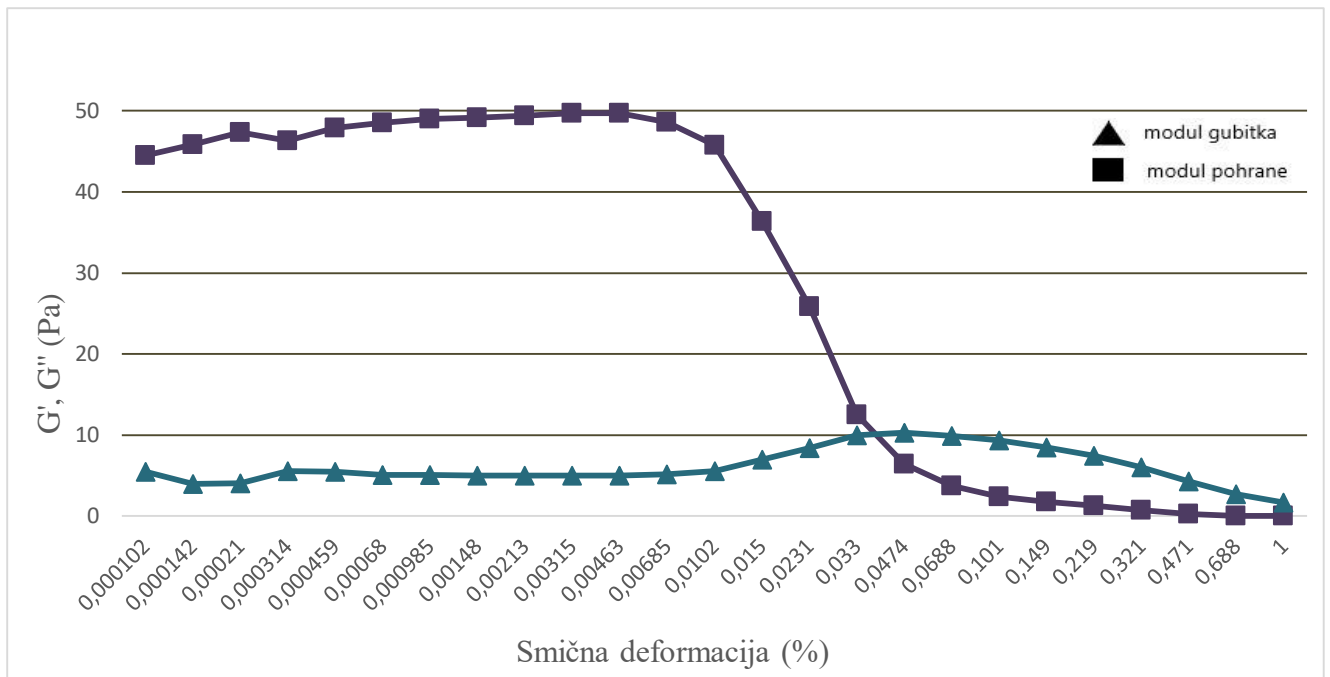
**Slika 12.** Ovisnost modula pohrane (G') i modula gubitka (G'') nanoemulzije s najmanjim udjelom gelan gume (0,05%; NG1) o smičnoj deformaciji nakon miješanja s ATS-om pri temperaturi od 34°C. Mjerenja su provedena u duplikatu.



**Slika 13.** Ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) nanoemulzije s 0,1% gelan gume (NG2) o smičnoj deformaciji nakon miješanja s ATS-om pri temperaturi od 34°C. Mjerenja su provedena u duplikatu.



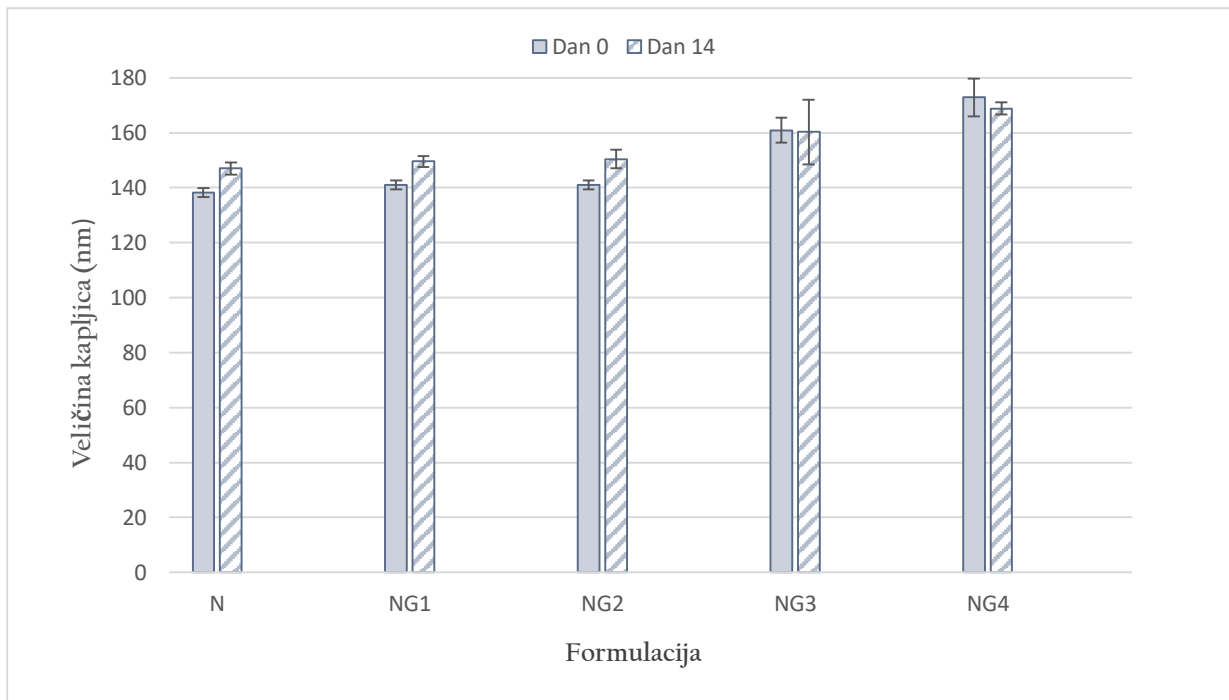
**Slika 14.** Ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) nanoemulzije s 0,2% gelan gume (NG3) o smičnoj deformaciji nakon miješanja s ATS-om pri temperaturi od 34°C. Mjerenja su provedena u duplikatu.



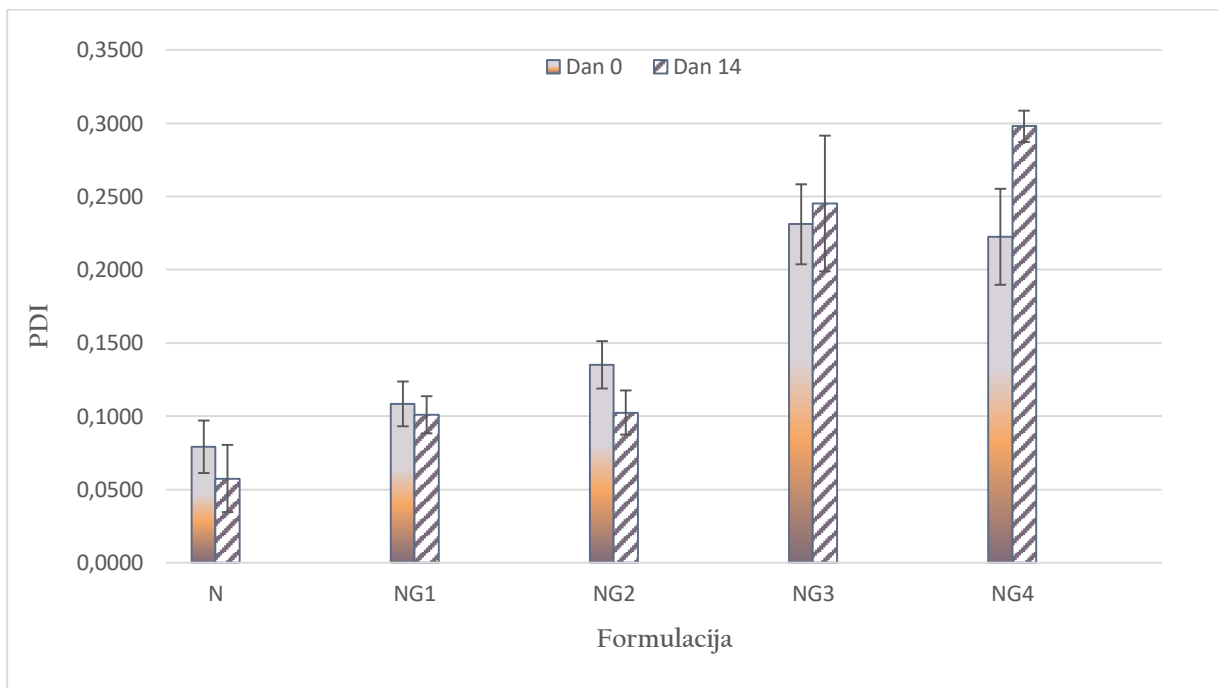
**Slika 15.** Ovisnost modula pohrane ( $G'$ ) i modula gubitka ( $G''$ ) nanoemulzije s najvećim udjelom gelan gume (0,4%; NG4) o smičnoj deformaciji nakon miješanja s ATS-om pri temperaturi od 34°C. Mjerenja su provedena u duplikatu.

#### 4.4. Stabilnost nanoemulzija

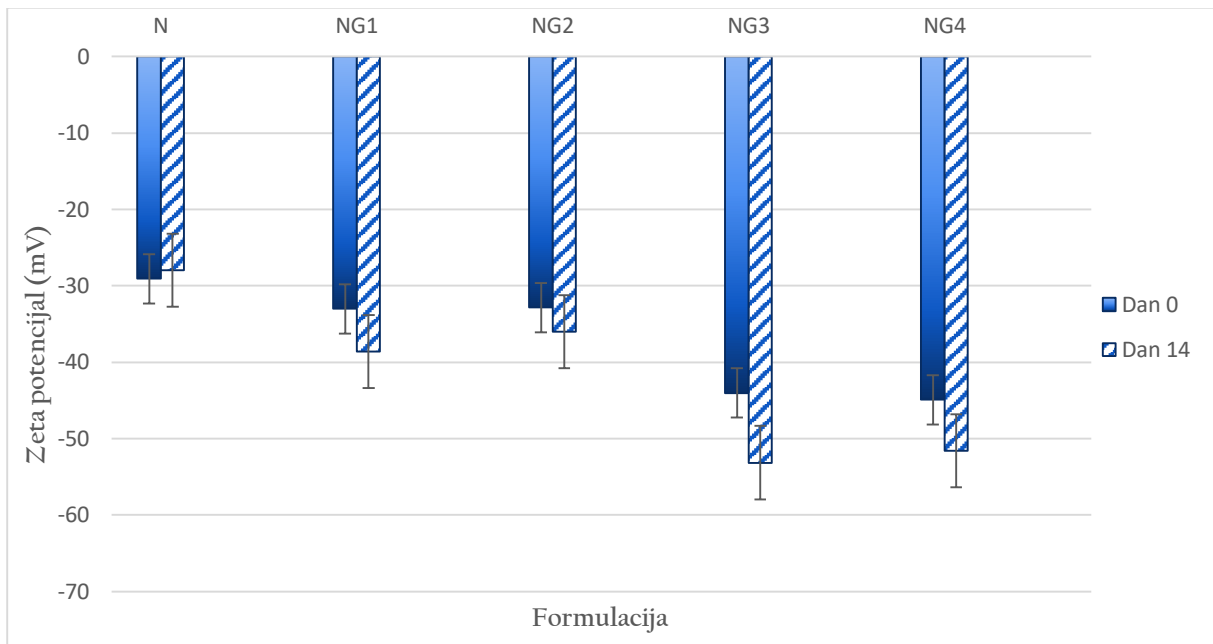
Nakon uspješne izrade, nanoemulzije moraju zadržati svoje fizikalno-kemijske karakteristike tijekom perioda čuvanja kako bi ostale stabilne. Važno je provesti istraživanja koja će pružiti uvid u stabilnost nanoemulzija pod različitim uvjetima skladištenja, uključujući i sobnu temperaturu kao što je to slučaj u sklopu ovog diplomskog rada. 14 dana nakon izrade i čuvanja nanoemulzija pri sobnoj temperaturi određeni su: veličina kapljica, PDI, zeta potencijal i pH-vrijednost. Usporedbe fizikalno-kemijskih karakteristika nanoemulzija na dan izrade i nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi prikazane su Slikama 16, 17, 18 i 19.



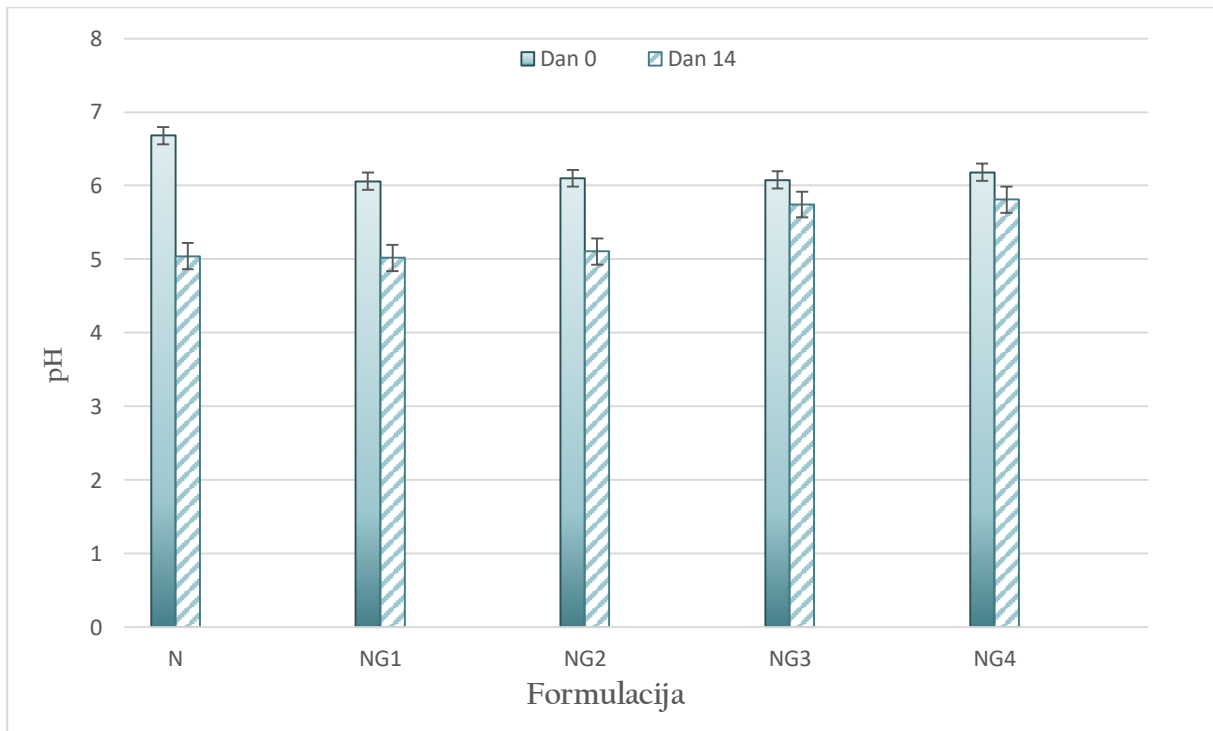
**Slika 16.** Usporedba veličine kapljica na dan izrade formulacija i nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=2).



**Slika 17.** Usporedba PDI na dan izrade formulacija i nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=2).



**Slika 18.** Usporedba zeta potencijala nanoemulzija na dan izrade i nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=2).



**Slika 19.** Usporedba pH vrijednosti nanoemulzija na dan izrade i nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (n=2).



Iz grafičkih prikaza proizlazi zaključak da je kod svih izrađenih nanoemulzija veličina kapljica ostala gotovo nepromijenjena (Slika 16).

Vrijednosti PDI također se nisu bitno promijenile nakon spomenutog perioda čuvanja, osim kod formulacije NG4 s najvećim udjelom gelan gume (Slika 17). Kod te je formulacije uočen porast PDI vrijednosti s 0,222 na 0,293 što ukazuje na potencijalno manju stabilnost formulacije NG4 u usporedbi s ostalim nanoemulzijama izrađenim u sklopu ovog diplomskog rada. Ipak, bitno je napomenuti da su sve formulacije nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi ostale vizualno nepromijenjene, odnosno da nije uočeno vrhnjenje, kao ni razdvajanje faza.

Vrijednosti zeta potencijala nanoemulzija s gelan gumom blago su se pomaknule prema negativnijim vrijednostima (Slika 18) što, prema literaturnim navodima, pogoduje stabilnosti nanoemulzija (Rai i sur., 2018).

Prisutno je blago smanjenje pH kod kontrolne nanoemulzije bez gelan gume te kod nanoemulzija s nižim udjelom gelan gume (NG1 i NG2), dok je kod nanoemulzija s većim udjelom gelan gume (NG3 i NG4) ta promjena zanemariva (Slika 19). Ipak, pH vrijednost svih formulacija je i nakon spomenutog perioda čuvanja ostala unutar prihvatljivog raspona vrijednosti za oftalmičku primjenu (4-8) (Gawin-Mikołajewicz i sur., 2021).

## 5. ZAKLJUČAK

- ❖ Visokoenergetskom metodom mikrofluidizacije su uspješno izrađene nanoemulzije s rastućom koncentracijom gelan gume (0,05 – 0,4%).
- ❖ Prosječna veličina kapljica svih pripremljenih formulacija je u nanometarskom području (141,1 – 172,9 nm) uz primijećen blagi porast veličine kapljica kod većih koncentracija gelan gume.
- ❖ PDI je prihvatljivih vrijednosti (do 0,222) te ukazuje na to da su izrađene nanoemulzije monodisperzni sustavi; zeta potencijal je očekivano negativan, u rasponu apsolutnih vrijednosti 33,0 - 44,9 mV koje upućuju na zadovoljavajuću stabilnost sustava.
- ❖ pH vrijednosti nanoemulzija su unutar raspona prikladnog za oftamličku primjenu.
- ❖ Viskoznost nanoemulzija raste s porastom koncentracije gelan gume što je u skladu s očekivanjima. Vrijednosti viskoznosti svih formulacija su prikladne za oftalmičku primjenu.
- ❖ Krivulje viskoznosti (ovisnost viskoznosti o brzini smicanja) pokazale su da je jedino NG4 formulacija (nanoemulzija s najvećim udjelom gelan gume) pseudoplastični sustav kojem se viskoznost smanjuje s povećanjem brzine smicanja. Kontrolna nanoemulzija bez gelan gume (N) i nanoemulzije s udjelom gelan gume 0,05-0,2% (NG1-NG3) pokazale su linearnu ovisnost viskoznosti o primijenjenoj brzini smicanja što znači da predstavljaju Newtonove sustave.
- ❖ Test promjene amplitude pokazao je da su NG3 i NG4 formulacije s udjelima gelan gume 0,2 i 0,4% uspješno gelirane nakon miješanja s ATS-om u fiziološki relevantnim uvjetima, dok je kod kontrolne nanoemulzije bez gelan gume (N) i formulacija s nižim udjelima gelan gume (NG1 i NG2) geliranje izostalo zbog nedovoljne koncentracije gelan gume.

- ❖ Ispitivanje stabilnosti nanoemulzija nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi pokazalo je da se veličina kapljica izrađenih formulacija nije bitno promijenila. Vrijednosti PDI su se neznatno promijenile kod svih formulacija osim kod NG4 gdje je uočen blagi porast vrijednosti PDI. Zeta potencijal je ostao u rasponu vrijednosti karakterističnih za stabilne sustave. pH vrijednost svih formulacija ostala je u rasponu vrijednosti prihvatljivih za oftalmičku primjenu. Sve su formulacije nakon spomenutog perioda čuvanja ostale vizualno nepromijenjene.
  
- ❖ Formulacije NG3 i NG4 ističu se kao vodeće formulacije s *in situ* gelirajućim svojstvima dokazanim *in vitro*, što ih čini prikladnim kandidatima za daljnja ispitivanja. Navedene bi formulacije mogle biti korisne u uklanjanju simptoma bolesti suhog oka gdje bi, objedinjujući svojstva nanoemulzija i *in situ* gelirajućih sustava, omogućile nadoknadu vodene, lipidne i mucinske komponente suznog filma uz istovremenu rjeđu potrebu za doziranjem. Formulacije NG3 i NG4 mogle bi također biti prikladne za uklapanje djelatnih tvari za liječenje bolesti suhog oka, čime bi se povećala njihova bioraspodivnost te smanjila učestalost doziranja.

## 6. LITERATURA

Acharya, P.C., Soares, D., Shetty, S., Fernandes, C. & Tekade, R.K., 2018, 'Rheology and Its Implications on Performance of Liquid Dosage Forms', *Dosage Form Design Considerations: Volume I*, pp. 549–597, Elsevier.

Agarwal, P. & Rupenthal, I.D., 2016, *Modern approaches to the ocular delivery of cyclosporine A*, *Drug Discovery Today*, 21(6), 977–988.

Agrawal, A.K., Das, M. & Jain, S., 2012, *In situ gel systems as 'smart' carriers for sustained ocular drug delivery*, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(4), 383–402.

Almeida, H., Amaral, M.H., Lobão, P. & Lobo, J.M.S., 2014, *In situ gelling systems: A strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations*, *Drug Discovery Today*, 19(4), 400–412.

Amplitude sweeps, <https://wiki.anton-paar.com/en/amplitude-sweeps/>, pristupljeno 04.03.2024.

Anton, N. & Vandamme, T.F., 2011, *Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences*, *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985.

Baudouin, C., Messmer, E.M., Aragona, P., Geerling, G., Akova, Y.A., Benítez-Del-Castillo, J., Boboridis, K.G., Merayo-Llodes, J., Rolando, M. & Labetoulle, M., 2016, *Revisiting the vicious circle of dry eye disease: A focus on the pathophysiology of meibomian gland dysfunction*, *British Journal of Ophthalmology*, 100(3), 300–306.

BeMiller, J.N., 2019, 'Gellans, Curdlan, Dextrans, Levans, and Pullulan', *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, pp. 271–278, Elsevier.

Bhalerao, H., Koteswara, K.B. & Chandran, S., 2019, 'Levofloxacin Hemihydrate In Situ Gelling Ophthalmic Solution: Formulation Optimization and In Vitro and In Vivo Evaluation', *AAPS PharmSciTech*, 20(7).

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

Bron, A.J., Paiva, C.S. de, 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*, *Ocular Surface*, 15(3), 438–510.

Carlfors, J., Edsman, K., Petersson, R. & Jorning, K., 1998, *Rheological evaluation of Gelrite® in situ gels for ophthalmic use*, vol. 6.

Castro-Balado, A., Mondelo-García, C., Zarra-Ferro, I. & Fernández-Ferreiro, A., 2020, 'New ophthalmic drug delivery systems', *Farmacia Hospitalaria*, 44(4), 149–157.

Cassanelli, M., Prosapio, V., Norton, I. & Mills, T., 2018, 'Acidified/basified gellan gum gels: The role of the structure in drying/rehydration mechanisms', *Food Hydrocolloids*, 82, 346–354.

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*, *Ocular Surface*, 15(3), 276–283.

Destruel, P.L., Zeng, N., Seguin, J., Douat, S., Rosa, F., Brignole-Baudouin, F., Dufaÿ, S., Dufaÿ-Wojcicki, A., Maury, M., Mignet, N. & Boudy, V., 2020a, 'Novel in situ gelling ophthalmic drug delivery system based on gellan gum and hydroxyethylcellulose: Innovative rheological characterization, in vitro and in vivo evidence of a sustained precorneal retention time', *International Journal of Pharmaceutics*, 574.

Eysuvis kapi za oko, <https://www.drugs.com/eysuvis.html>, pristupljeno 04.02.2024.

Gawin-Mikołajewicz, A., Nartowski, K.P., Dyba, A.J., Gołkowska, A.M., Malec, K. & Karolewicz, B., 2021, *Ophthalmic Nanoemulsions: From Composition to Technological Processes and Quality Control*, *Molecular Pharmaceutics*, 18(10), 3719–3740.

Gomes, D., Batista-Silva, J.P., Sousa, A. & Passarinha, L.A., 2023, *Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications*, *Carbohydrate Polymers*, 311.

Gugleva, V., Titeva, S., Ermenlieva, N., Tsibranska, S., Tcholakova, S., Rangelov, S. & Momekova, D., 2020, 'Development and evaluation of doxycycline niosomal thermoresponsive in situ gel for ophthalmic delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 591.

Haber, S.L., Benson, V., Buckway, C.J., Gonzales, J.M., Romanet, D. & Scholes, B., 2019, *Lifitegrast: a novel drug for patients with dry eye disease*, *Therapeutic Advances in Ophthalmology*, 11.

Hegde, R.R., Verma, A. & Ghosh, A., 2013, 'Microemulsion: New Insights into the Ocular Drug Delivery', *ISRN Pharmaceutics*, 2013, 1–11.

Ikervis kapi za oko, <https://www.drugs.com/uk/ikervis.html>, pristupljeno 30.01.2024.

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*, *Ocular Surface*, 15(3), 575–628.

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

Kawahara, A., 2023, *Treatment of Dry Eye Disease (DED) in Asia: Strategies for Short Tear Film Breakup Time-Type DED*, *Pharmaceutics*, 15(11).

Li, Y., Cui, L., Lee, H.S., Kang, Y.S., Choi, W. & Yoon, K.C., 2017, 'Comparison of 0.3% Hypotonic and Isotonic Sodium Hyaluronate Eye Drops in the Treatment of Experimental Dry Eye', *Current Eye Research*, 42(8), 1108–1114.

Liu, H., Begley, C., Chen, M., Bradley, A., Bonanno, J., McNamara, N.A., Nelson, J.D. & Simpson, T., 2009, 'A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(8), 3671–3679.

Morris, E.R., Nishinari, K. & Rinaudo, M., 2012, *Gelation of gellan - A review*, *Food Hydrocolloids*, 28(2), 373–411.

Oliveira, J.T., Martins, L., Picciochi, R., Malafaya, P.B., Sousa, R.A., Neves, N.M., Mano, J.F. & Reis, R.L., 2010, 'Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications', *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 93(3), 852–863.

Pepić, I., 2004, *Novi sustavi za primjenu lijeka u oko*.

Petrochenko, P.E., Pavurala, N., Wu, Y., Yee Wong, S., Parhiz, H., Chen, K., Patil, S.M., Qu, H., Buoniconti, P., Muhammad, A., Choi, S., Kozak, D., Ashraf, M., Cruz, C.N., Zheng, J. & Xu, X., 2018, 'Analytical considerations for measuring the globule size distribution of cyclosporine ophthalmic emulsions', *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1–2), 229–239.

Phadatare, S.P., Momin, M., Nighojkar, P., Askarkar, S. & Singh, K.K., 2015, 'A Comprehensive Review on Dry Eye Disease: Diagnosis, Medical Management, Recent Developments, and Future Challenges', *Advances in Pharmaceutics*, 2015, 1–12.

Qamar, Z., Qizilbash, F.F., Iqbal, M.K., Ali, A., Narang, J.K., Ali, J. & Baboota, S., 2019, 'Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective', *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 13(4), 246–254.

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*, *Journal of Controlled Release*, 270, 203–225.

Reed, K., Li, A., Wilson, B. & Assamoi, T., 2016, 'Enhancement of Ocular in Situ Gelling Properties of Low Acyl Gellan Gum by Use of Ion Exchange', *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 32(9), 574–582.

Restasis® Eye Drops for Chronic Dry Eye, <https://www.restasis.com/about-restasis/restasis-and-artificial-tears>, pristupljeno 04.02.2024.

Rolando, M. & Zierhut, M., 2001, *SURVEY OF OPHTHALMOLOGY VOLUME 45 • SUPPLEMENT 2 • MARCH 2001 The Ocular Surface and Tear Film and Their Dysfunction in Dry Eye Disease*.

Rouen, P.A. & White, M.L., 2018, *DRY EYE*, vol. 36.

Salunke, S.R. & Patil, S.B., 2016, 'Ion activated in situ gel of gellan gum containing salbutamol sulphate for nasal administration', *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 41–47.

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

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

Tayel, S.A., El-Nabarawi, M.A., Tadros, M.I. & Abd-Elsalam, W.H., 2013, 'Promising ion sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits', *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1–2), 293–305.

Willcox, M.D.P., Argüeso, 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., Uçakhan, O. & Jones, L., 2017, *TFOS DEWS II Tear Film Report*, *Ocular Surface*, 15(3), 366–403.

Xiidra FDA Approval, <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-xiidra-lifitegrast-ophthalmic-solution-dry-eye-4406.html>, pristupljeno 22.01.2024.

Yao, W., Davidson, R.S., Durairaj, V.D. & Gelston, C.D., 2011, *Dry eye syndrome: An update in office management*, *American Journal of Medicine*, 124(11), 1016–1018.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Bolest suhog oka je kompleksna, multifaktorijalna bolest površine oka karakterizirana gubitkom homeostaze suznog filma. Nanoemulzije predstavljaju inovativne terapijske sustave za oftalmičku primjenu koji omogućuju zadovoljavajuću bioraspodjelivost, produženo vrijeme zadržavanja na površini oka te nadoknadu i stabilizaciju suznog filma. *In situ* gelirajući oftalmički sustavi omogućuju produženo vrijeme zadržavanja pripravka na mjestu primjene zahvaljujući karakterističnom faznom prijelazu iz tekućine u gel te predstavljaju jednu od inovativnih tehnoloških platformi za dostavu djelatnih tvari na površinu oka. Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti *in situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije s gelan gumom (0,05-0,4%) kao polimerom čiji je fazni prijelaz u gel potaknut fiziološki prisutnim kationima suzne tekućine te ispitati njihova fizikalno-kemijska i reološka svojstva. Nanoemulzijama pripremljenim na mikrofluidizatoru izmjerene su prosječna veličina kapljica, PDI, zeta potencijal i pH-vrijednost. Rezultati mjerenja pokazali su da je prosječna veličina kapljica 141,1-172,9 nm, PDI u rasponu 0,108-0,222 ukazuje na monodisperzne sustave, vrijednosti zeta-potencijala su negativne (-33,0 do -44,9 mV) te upućuju na zadovoljavajuću stabilnost formulacija, a pH-vrijednost svih formulacija prikladna je za oftalmičku primjenu (6,06–6,18). Sve su formulacije ostale stabilne nakon 14 dana čuvanja pri sobnoj temperaturi. Reološke karakteristike formulacija ispitane su prije i nakon miješanja s ATS-om. Rezultati su pokazali da je jedino formulacija s najvećim udjelom gelan gume (0,4%) pseudoplastični sustav, dok su ostale formulacije Newtonovi sustavi. Na temelju testa promjene amplitude nakon miješanja formulacija s ATS-om u fiziološki relevantnim uvjetima zaključeno je da kod formulacija s nižim udjelima gelan gume (0,05-0,1%) ne dolazi do geliranja, dok kod formulacija s većim udjelima gelan gume (0,2 i 0,4%) dolazi do faznog prijelaza u gel zbog interakcije gelan gume i kationa prisutnih u ATS-u. S obzirom na dobivene rezultate formulacije s 0,2 i 0,4% gelan gume ističu se kao vodeće formulacije za daljnja ispitivanja u unaprjeđenju liječenja bolesti suhog oka.



Dry eye disease is a complex, multifactorial condition of the ocular surface characterized by the loss of tear film homeostasis. Nanoemulsions represent innovative therapeutic systems for ophthalmic application that enable adequate bioavailability, prolonged retention time on the ocular surface, and replenishment and stabilization of the tear film. *In situ* gelling ophthalmic systems allow prolonged retention time of the formulation at the site of application due to the characteristic phase transition from liquid to gel, representing one of the innovative technological platforms for delivering active substances to the ocular surface. The aim of this thesis was to develop *in situ* gelling ophthalmic nanoemulsions with increasing concentrations of gellan gum (0.05-0.4%) as the gelling polymer, whose phase transition is induced by physiologically present cations in the tear fluid, and to investigate their physicochemical and rheological properties. The nanoemulsions were characterized for average droplet sizes, polydispersity index (PDI), zeta potential, and pH value. The results of physicochemical measurements showed that the average droplet size ranged from 141.1 to 172.9 nm, PDI fell within acceptable values (0.108-0.222), zeta potential values were negative (-33.0 to -44.9 mV), indicating satisfactory formulation stability, and the pH values of all formulations were suitable for ophthalmic application (6.06-6.18). Rheological characteristics were examined by viscosity curve analysis before and after mixing with ATS and by amplitude sweep test after mixing with ATS. The viscosity curve results showed that only the formulation with the highest concentration of gellan gum (0.4%) exhibited pseudoplastic behavior, while the other formulations were Newtonian systems. Based on the amplitude sweep test, it is concluded that in formulations with lower concentrations of gellan gum (0.05-0.1%), no gel formation occurred, whereas in formulations with higher concentrations of gellan gum (0.2 and 0.4%), gel formation occurred due to interaction between cations present in ATS and sufficient concentration of gellan gum. Considering the obtained results, formulations with 0.2 and 0.4% gellan gum stand out as leading formulations for further investigation in the improvement of dry eye disease treatment.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### *In situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije za liječenje bolesti suhog oka

**Marta Đurek**

#### SAŽETAK

Bolest suhog oka je kompleksna, multifaktorijalna bolest površine oka karakterizirana gubitkom homeostaze suznog filma. Nanoemulzije predstavljaju inovativne terapijske sustave za oftalmičku primjenu koji omogućuju zadovoljavajuću bioraspoloživost, produljeno vrijeme zadržavanja na površini oka te nadoknadu i stabilizaciju suznog filma. *In situ* gelirajući oftalmički sustavi omogućuju produljeno vrijeme zadržavanja pripravka na mjestu primjene zahvaljujući karakterističnom faznom prijelazu iz tekućine u gel te predstavljaju jednu od inovativnih tehnoloških platformi za dostavu djelatnih tvari na površinu oka. Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti *in situ* gelirajuće oftalmičke nanoemulzije s rastućom koncentracijom gelan gume (0,05-0,4%) kao gelirajućeg polimera čiji je fazni prijelaz potaknut fiziološki prisutnim kationima suzne tekućine te ispitati fizikalno-kemijska i reološka svojstva. Nanoemulzijama su izmjerene prosječne veličine kapljica, PDI, zeta potencijal i pH-vrijednost. Rezultati fizikalno-kemijskih mjerenja pokazali su da je prosječna veličina kapljica (141,1-172,9 nm), PDI je u rasponu prihvatljivih vrijednosti (0,108-0,222), vrijednosti zeta-potencijala su negativne vrijednosti (-33,0 do -44,9 mV) koje upućuju na zadovoljavajuću stabilnost formulacija, pH-vrijednost svih formulacija je prikladna za oftalmičku primjenu (6,06-6,18). Reološke karakteristike su ispitane krivuljom viskoznosti prije i nakon miješanja s ATS-om, te testom promjene amplitude nakon miješanja s ATS-om. Rezultati krivulje viskoznosti pokazali su da je jedino formulacija s najvećim udjelom gelan gume (0,4%) pseudoplastični sustav, dok su ostale formulacije Newtonovi sustavi. Na temelju testa promjene amplitude zaključeno je da kod formulacija s nižim udjelima gelan gume (0,05-0,1%) ne dolazi do geliranja nanoemulzija, dok kod formulacija s većim udjelima gelan gume (0,2 i 0,4%) dolazi do stvaranja gela na temelju interakcije kationa prisutnih u ATS-u i dostatne koncentracije gelan gume. S obzirom na dobivene rezultate formulacije s 0,2 i 0,4% gelan gume ističu se kao vodeće formulacije za daljnja ispitivanja u unaprjeđenju liječenja bolesti suhog oka.

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

Rad sadrži: 44 stranice, 19 grafičkih prikaza, 3 tablice i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Nanoemulzija, bolest suhog oka, *in situ* gelirajući sustavi, gelan guma, ATS, viskoznost

Mentor: **Dr. sc. Bisera Jurišić Dukovski** znanstvena suradnica, *PLIVA Hrvatska d.o.o., Sveučilište u Zagrebu Farmaceutusko-biokemijski fakultet*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Bisera Jurišić Dukovski** znanstvena suradnica, *PLIVA Hrvatska d.o.o., Sveučilište u Zagrebu Farmaceutusko-biokemijski fakultet*

**Dr. sc. Laura Nižić Nodilo**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu *Farmaceutusko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Emerik Galić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu *Farmaceutusko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### *In situ* gelling ophthalmic nanoemulsions for the treatment of dry eye disease

**Marta Đurek**

#### SUMMARY

Dry eye disease is a complex, multifactorial condition of the ocular surface characterized by the loss of tear film homeostasis. Nanoemulsions represent innovative therapeutic systems for ophthalmic application that enable adequate bioavailability, prolonged retention time on the ocular surface, and replenishment and stabilization of the tear film. *In situ* gelling ophthalmic systems allow prolonged retention time of the formulation at the site of application due to the characteristic phase transition from liquid to gel, representing one of the innovative technological platforms for delivering active substances to the ocular surface. The aim of this thesis was to develop *in situ* gelling ophthalmic nanoemulsions with increasing concentrations of gellan gum (0.05-0.4%) as the gelling polymer, whose phase transition is induced by physiologically present cations in the tear fluid, and to investigate their physicochemical and rheological properties. The nanoemulsions were characterized for average droplet sizes, polydispersity index (PDI), zeta potential, and pH value. The results of physicochemical measurements showed that the average droplet size ranged from 141.1 to 172.9 nm, PDI fell within acceptable values (0.108-0.222), zeta potential values were negative (-33.0 to -44.9 mV), indicating satisfactory formulation stability, and the pH values of all formulations were suitable for ophthalmic application (6,06-6,18). Rheological characteristics were examined by viscosity curve analysis before and after mixing with ATS and by amplitude sweep test after mixing with ATS. The viscosity curve results showed that only the formulation with the highest concentration of gellan gum (0.4%) exhibited pseudoplastic behavior, while the other formulations were Newtonian systems. Based on the amplitude sweep test, it is concluded that in formulations with lower concentrations of gellan gum (0.05-0.1%), no gel formation occurred, whereas in formulations with higher concentrations of gellan gum (0.2 and 0.4%), gel formation occurred due to interaction between cations present in ATS and sufficient concentration of gellan gum. Considering the obtained results, formulations with 0.2 and 0.4% gellan gum stand out as leading formulations for further investigation in the improvement of dry eye disease treatment.

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

Thesis includes: 44 pages, 19 figures, 3 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Nanoemulsion, dry eye disease, *in situ* gelling systems, gellan gum, ATS, viscosity

Mentor: **Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D.** *Research Associate, PLIVA Croatia Ltd., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D.** *Research Associate, PLIVA Croatia Ltd., University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Laura Nižić Nodilo, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Emerik Galić, Ph.D.** *Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: April 2024