

Mukoadhezija farmaceutskih otopina koje sadrže natrijev hijaluronat - utjecaj koncentracije i molekulske mase natrijeva hijaluronata

Strbad, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:831236>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-08**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Klara Strbad

Mukoadhezija farmaceutskih otopina koje sadrže
natrijev hijaluronat - utjecaj koncentracije i molekulske
mase natrijevog hijaluronata

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova“

Klara Strbad

Mukoadhezija farmaceutskih otopina koje sadrže
natrijev hijaluronat - utjecaj koncentracije i molekulske
mase natrijevog hijaluronata

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: prof.dr.sc. Jasminka Giacometti

Komentor rada: dr.sc. Dijana Jureša

Diplomski rad obranjen je dana 26. rujna 2023. pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Jurica Novak
2. izv. prof. dr. sc. Duško Čakara
3. prof.dr.sc. Jasminka Giacometti

Rad ima 59 stranica, 22 slike, 7 tablica i 49 literaturnih navoda

ZAHVALA

Ovaj diplomski rad izrađen je u odjelu Istraživanja i razvoja, u Jadran-galenski laboratoriju d.d., Rijeka

Iznimno se zahvaljujem komentorici dr.sc. Dijani Jureša na pruženoj pomoći i razumijevanju tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Hvala Vam na strpljenju i svim savjetima koje ste mi dali.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Jasminka Giacometti na suradnji i pomoći. Također, zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Dušku Čakari na savjetima i pomoći u pisanju rada.

Hvala svim djelatnicima JGL-a koji su mi pomogli tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja. Posebno hvala mojim roditeljima i sestrama na ljubavi, pomoći i podršci koje mi pružaju cijeli život.

SAŽETAK

Otopine natrijeva hijaluronata koriste se kao umjetne suze koje vlaže i regeneriraju oko. Natrijev hijaluronat kao polimer sastavljen od ponavljajućih jedinica disaharida D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukozamina pokazuje i mukoadhezivno svojstvo, što znači da stvara interakciju s mucinom koji je sastavni dio sluznice na površini oka. Stvarajući te interakcije produljuje se zadržavanje otopine na sluznici. Svrha ovog rada je ispitati utjecaj faktora koji mogu povećati zadržavanje otopine natrijeva hijaluronata na sluznici.

Ispitalo se kako molekulska masa i koncentracija natrijeva hijaluronata u otopini te osmolalnost otopine utječu na mukoadheziju otopina. Također, ispitala su se reološka svojstva i osobine (viskoznost, pH, osmolalnost i površinska napetost) otopina natrijeva hijaluronata različitih intrinzičnih viskoznosti 0,6 m³/kg, 1,7 m³/kg i 2,3 m³/kg (odgovaraju redom molekulskim masama 244 kDa, 980 kDa i 1420 kDa) triju masenih udjela: 0,21%; 0,4% i 0,6%, u hipotoničnim, izotoničnim i hipertoničnim uvjetima.

S povećanjem masenog udjela natrijeva hijaluronata, kao i s povećanjem njegove molekulske mase viskoznosti otopina rastu, dok povećanje osmolalnosti otopina smanjuje viskoznost neovisno o molekulskoj masi i masenom udjelu natrijeva hijaluronata. Također ispitala se i stabilnost svih otopina, nakon čuvanja na temperaturi od 50 °C tijekom tri mjeseca. U svim slučajevima došlo je do pada viskoznosti otopina dok nije bilo značajnih promjena drugih parametara.

Pomoću reoloških mjerenja na reometru, uz svinjski želučani mucin, određen je relativni reološki sinergizam koji ukazuje postoji li interakcija između otopine i mucina. Izotonične otopine intrinzičnih viskoznosti natrijeva hijaluronata 1,7 m³/kg i 2,3 m³/kg s masenim udjelom od 0,4% pokazale su interakciju s mucinom, dok otopina sa natrijevim hijaluronatom najniže intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg nije pokazala interakciju. Bitno je

napomenuti da ta otopina je jedina pokazala Newtonovo reološko ponašanje.

Porast osmolalnosti otopine pokazao je povećanje interakcije s mucinom kao i povećanje masnog udjela natrijeva hijaluronata. Ovi su se utjecaji ispitali na otopinama s natrijevim hijaluronatom intrinzične viskoznosti 1,7 m³/kg.

Interakciju s mucinom povećalo je veći maseni udio soli u otopini (veća osmolalnost) i porast masenog udjela natrijeva hijaluronata, dok dobiveni rezultati ne pokazuju proporcionalan odnos interakcije s mucinom i molekulske mase natrijeva hijaluronata. Navedeno treba potvrditi uključivanjem u ispitivanje više natrijevih hijaluronata u širem području molekulskih masa (intrinzičnih viskoznost), te pomoću drugih metoda za određivanje mukoadhezije.

Ključne riječi: natrijev hijaluronat, viskoznost, mukoadhezija, reološke karakteristike

SUMMARY

Sodium hyaluronate solutions are used as artificial tears that moisturize and regenerate the eye. Sodium hyaluronate as a polymer composed of repeating units of the disaccharide D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine also exhibits mucoadhesive properties, which means that it interacts with mucin, a part of the mucous membrane on the surface of the eye. By creating these interactions, the retention of the solution on the mucous membrane is prolonged. The purpose of this paper is to examine the influence of factors that can increase retention on the mucous membrane.

It was tested how the molecular weight and mass fraction of sodium hyaluronate in the solution, and osmolality of the solution affect the mucoadhesion of the solutions. Also, the rheological properties and characteristics (viscosity, pH, osmolality and surface tension) of solutions with different intrinsic viscosities of sodium hyaluronate 0.6 m³/kg, 1.7 m³/kg, and 2.3 m³/kg (respectively molecular weight ≈250 kDa, ≈980 kDa and ≈1420 kDa) were tested in three mass fractions: 0.21%; 0.4% and 0.6%, in hypotonic, isotonic, and hypertonic conditions.

With an increase in the mass fraction of sodium hyaluronate, as well as with an increase in its molecular weight, the viscosity of the solution increases, while an increase in the osmolality of the solution decreases the viscosity, regardless of the molecular weight and mass fraction of sodium hyaluronate. The stability of all solutions was also tested after storage at temperature 50 °C for three months. In all cases, there was a decrease in the viscosity of the solutions, while there were no significant changes in other parameters.

Using rheological measurements on a rheometer, relative rheological synergism was determined with porcine gastric mucin, which indicates whether there is an interaction between the solution and the mucin. Isotonic solutions of sodium hyaluronate with intrinsic viscosities of 1.7

m^3/kg and $2.3 \text{ m}^3/\text{kg}$ in a mass fraction of 0.4% showed interaction with mucin, while the solution with sodium hyaluronate with the lowest intrinsic viscosity of $0.6 \text{ m}^3/\text{kg}$ did not show interaction. It is important to note that this solution was the only one that showed Newtonian rheological behavior.

The increase in the osmolality of the solution showed an increase in the interaction with mucin as well as an increase in the mass fraction of sodium hyaluronate. This influence was tested on solutions with sodium hyaluronate with an intrinsic viscosity of $1.7 \text{ m}^3/\text{kg}$.

The interaction with mucin increases with a higher mass fraction of salt in the solution (higher osmolality) and an increase in the mass fraction of sodium hyaluronate, while the obtained results do not show a proportional relationship between the interaction with mucin and the molecular weight of sodium hyaluronate. The above should be confirmed by including more sodium hyaluronates in a wider range of molecular masses (intrinsic viscosity) in the test, and by using other methods for determining mucoadhesion.

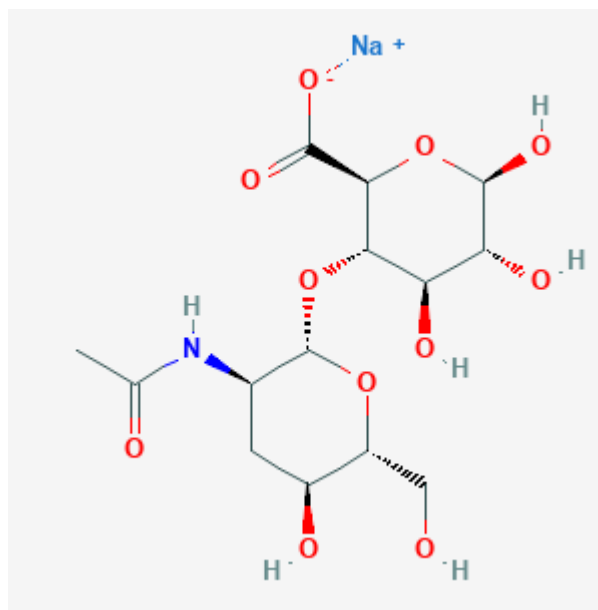
Key words: sodium hyaluronate, viscosity, mucoadhesion, rheological characteristics

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Proizvodnja	2
1.2. Primjena	3
1.2.1. Natrijev hijaluronat u kapima za oči.....	4
1.3. Reologija	5
1.3.1 Reologija otopina natrijeva hijaluronata.....	6
1.3.2. Reološka karakterizacija pomoću reometra.....	7
1.3.3. Reološke metode u farmaceutskoj industriji.....	8
1.4. Mukoadhezija	8
1.4.1. Tehnika za određivanje mukoadhezije	9
2. CILJ RADA	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.2. Metode	12
3.2.1. Priprema otopina.....	12
3.2.2. Mjerenje pH.....	13
3.2.3. Mjerenje osmolalnosti.....	14
3.2.4. Mjerenje viskoznosti.....	14
3.2.5. Reološko mjerenje.....	15
3.2.6. Mjerenje površinske napetosti.....	15
3.2.7. Mukoadhenzivni test.....	15
4. REZULTATI	18
4.1. pH, osmolalnost i površinska napetost	20
4.2. Viskoznost i krivulje ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja	21
4.3. Otopine bez BAK-a	31
4.4. Mukoadhezijski test	33
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA	51
8. ŽIVOTOPIS	57

1. UVOD

Natrijev hijaluronat je natrijeva sol hijaluronske kiseline molekulske formule $C_{14}H_{22}NNaO_{11}$ (1). Ovaj spoj predstavlja suvremeni biomaterijal sa širokom primjenom u različitim farmaceutskim i medicinskim područjima (2). Po kemijskoj strukturi je dugo lančani polimer sastavljen od ponavljajućih jedinica disaharida D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukoamina (Slika 1.) (1). Disaharidi su vezani $\beta[1-4]$ vezama, a glukuronska kiselina i N-acetil-D-glukoamin međusobno su povezani s $\beta[1-3]$ vezama (2).



Slika 1.: Kemijska struktura natrijeva hijaluronata – D-glukuronska kiselina i N-acetil-D-glukoamin (izvor: National Center for Biotechnology Information; PubChem Compound)

Natrijev hijaluronat postoji u obliku bijelog vlaknastog ili kremasto-bijelog praha vrlo slabog mirisa (1). Potpuno je topljiv u vodi, gdje može stvoriti prozirnu, viskoznu otopinu (2). Također, ima sposobnost zadržavanja vode što doprinosi njegovim hidratizirajućim svojstvima (3). Natrijev hijaluronat ima viskoelastično svojstvo koje se povećava se s povećanjem molekulske mase odnosno povećanjem duljine lanca molekula (4).

Molekulska masa natrijevog hijaluronata može varirati ovisno o stupnju polimerizacije. U prosjeku, natrijev hijaluronat ima molekulsku masu u rasponu od 5000 do 2 milijuna Da (5). U slučaju natrijeva hijaluronata, tj.

polimera, intrinzična viskoznost je povezana s molekulskom masom spoja. Intrinzična viskoznost je mjera sposobnosti polimera da poveća viskoznost otapala kao rezultat njegove prisutnosti. Često se koristi za karakterizaciju veličine, oblika i interakcije polimernih molekula u otopini. Za polimere poput natrijeva hijaluronata, koji su dugi lanci ponavljajućih jedinica, intrinzična viskoznost se može povezati s molekulskom masom polimera pomoću Mark-Houwinkove jednadžbe:

$$\eta = K * M^a \quad [1]$$

gdje su K i a konstante za određeni polimer-otapalo par pri određenoj temperaturi. η označava intrinzičnu viskoznost, a M molekulsku masu spoja (6).

1.1. Proizvodnja

U prošlosti se natrijev hijaluronat dobivao ekstrakcijom iz pijetlove krijeste, iz ljudske pupčane vrpce kao i iz staklasta tijela očiju goveda (7). Kasnije je razvijena metoda mikrobne fermentacije kao još jedan način proizvodnje natrijeva hijaluronata. Prvi komercijalno fermentirani natrijev hijaluronat proizveden je koristeći bakteriju *Streptococcus zooepidemicus*, koja se i dalje koristi u industrijskoj proizvodnji (8). Zbog prisutnosti bakterijskih endotoksina, kondroitin sulfata, određenih proteina, nukleinskih kiselina i teških metala u natrijevom hijaluronatu dobivenom ovakvom fermentacijom u proizvodnji je nužan korak pročišćavanja, ali je i dalje ograničena primjena u biomedicinskom području zbog patogenosti same bakterije. Rekombinantna proizvodnja natrijeva hijaluronata pokazala se kao atraktivna alternativa. U ovoj metodi korištene su gram-pozitivne i gram-negativne bakterije uključujući *Bacillus sp.*, *Lactococcus lactis*, *Agrobacterium sp.* i *Escherichia coli* (9). Kompanija Novozymes razvila je metodu rekombinantne proizvodnje natrijeva hijaluronata koristeći nepatogeni soj *Bacillus subtilis*. Proizvodi dobiveni ovakvim načinom proizvodnje, smatraju se sigurnijim. Također, ovaj se postupak smatra

ekološki prihvatljivijim u odnosu na proizvodnju koristeći soj *Streptococcus zooepidemicus* (8).

1.2. Primjena

Natrijev hijaluronat danas ima široku upotrebu u medicini, farmaciji i kozmetici. Koristi se u liječenju osteoartroze, degenerativnih bolesti zglobova. Jedna od metoda terapije je viskosuplementacija. Ovaj se pojam odnosi na injekcije natrijeva hijaluronata ili natrijeva hijaluronata s hijaluronskom kiselinom u oštećeni zglob. Time se obnavlja viskoelastičnost u sinovijalnoj tekućini. Sinovijalna tekućina se nalazi u šupljinama zglobova, s primarnom ulogom smanjenja trenja između okolnih zglobova i hrskavica tijekom kretanja (10).

Zbog svojstva viskoelastičnosti, natrijev hijaluronat je postao vrlo popularan u intraokularnim operacijama. Jedan od prvih i najpoznatijih primjera je Healon (natrijev hijaluronat 1%, 4×10^6 Da) koji se koristi od 1979. godine (11). Koristi se u operaciji katarakte gdje služi za održavanje stabilne dubine prednje komore i štíćenje endotelnih stanica rožnice od oštećenja tijekom cijelog kirurškog zahvata. Također, se koristi u operaciji glaukoma, transplantaciji rožnice te u vitreoretinalnoj kirurgiji za poboljšanje kirurškog ishoda i smanjenje intraoperacijskih i postoperativnih komplikacija (12).

Natrijev se hijaluronat koristi u kozmetici kao sredstvo za regeneraciju kože. Smatra se vrhunskim sredstvom za hidratiziranje kože zbog svojih svojstava vezanja vode i stvaranja filma (2). Osim, što se može koristiti za regeneraciju i hidrataciju, natrijev hijaluronat ima i „antiaging“ svojstva. Pripravci koji sadrže natrijev hijaluronat imaju efekt smanjenja bora te povećanja elastičnost kože (13).

1.2.1. Natrijev hijaluronat u kapima za oči

Natrijev hijaluronat se koristi i u kapima za oči, točnije otopinama poznatim kao umjetne suze. Umjetne suze pružaju očima hidrataciju, njegu i zaštitu koja im je potrebna. Koriste se u liječenju sindroma suhog oka (2). Česti simptomi sindroma suhog oka su osjećaj suhoće u očima, pretjerano suzenje, pečenje u očima, preosjetljivost oka, osjećaj stranog tijela u očima, zamagljen vid, crvenilo, umor očiju te hiperosmolalnost. Kapi za oči koje sadrže natrijev hijaluronat učinkovito ublažavaju simptome kod blagog i umjereno suhog oka nadoknadom manjka volumena suza (13). Korištenjem ovog okularnog lubrikanta pruža se ugodna i podupire se prirodni proces cijeljenja, što vodi do bolje kvalitete života.

Natrijev hijaluronat potiče migraciju stanica i može stabilizirati epitelnu barijeru površine oka sugerirajući da bi mogao biti izravno uključen u proces popravka epitela preko CD44, hijaluronatnog receptora (14). Mehanizam djelovanja natrijeva hijaluronata je da deaktivira adhezijsku molekulu CD44, koja je receptor za natrijev hijaluronat te je izražena u stanicama rožnice i spojnice kod osoba sa sindromom suhog oka. Pokazalo se da interakcija hijaluronata i CD44 molekula stabilizira površinsku barijeru oka i suznog filma, stvarajući tako povoljno mikrookruženje površine oka koje povećava staničnu adheziju i pokretljivost te potiče staničnu migraciju (15). Također, natrijev hijaluronat može imati ulogu u kontroli lokaliziranih upala često prisutnih kod sindroma suhog oka. Natrijev hijaluronat povećava stabilnost predkornealnog suznog filma, koji štiti očnu površinu od okolišnih agenasa. Ima svojstva zadržavanja vode, s afinitetom 1000 puta većim od vlastite težine. To povećava vlažnost površine oka i smanjuje isparavanje suza. Svojstvo viskoelastičnosti omogućuje mu podmazivanje površine oka smanjujući trenje tijekom treptanja i očnih pokreta, čime se smanjuje mehaničko oštećenje rožnice (14).

1.3. Reologija

Reologija je znanstveno područje koje obuhvaća fenomen tečenja materije (krutina, tekućina i plinova) pod utjecajem vanjske sile (16). Taj utjecaj je naprezanje, σ (Pa), omjer između sile koja se primjenjuje, F (N) na jedinicu površine, A (m²):

$$\sigma = F/A \quad [2]$$

Dva ključna pojma u reologiji su elastičnost i viskoznost (17). Viskoznost se može opisati kao otpornost fluida na tečenje. Newton je definirao viskoznost, η (Pas) tekućine kao omjer između smicanja (naprezanja), σ (Pa) i brzine smicanja, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹):

$$\eta = \sigma/\dot{\gamma} \quad [3]$$

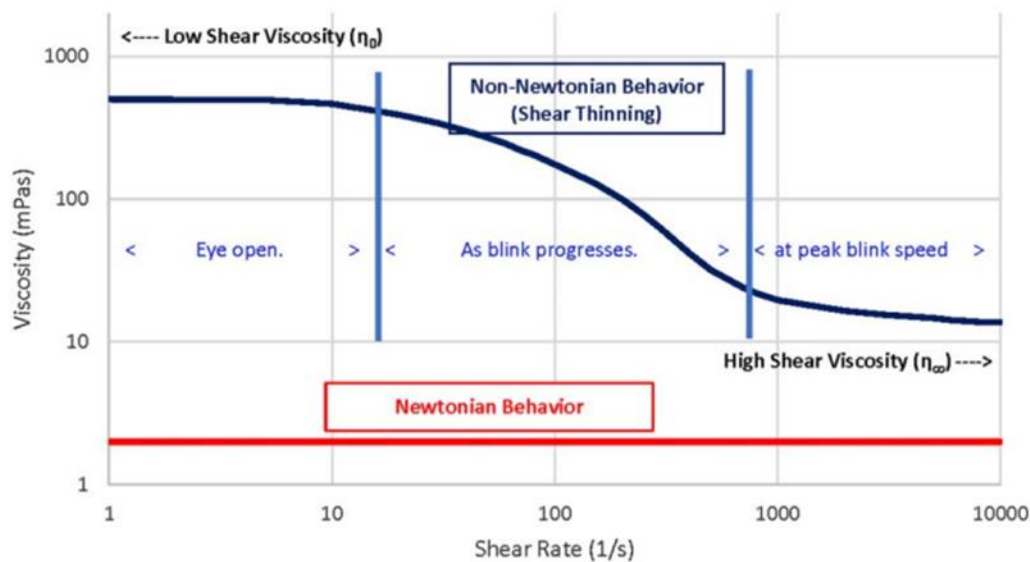
Utvrдио je da je ovaj omjer konstantan, što implicira da viskoznost tekućine ostaje konstantna s povećanjem brzine smicanja. Stoga, tekućine koje slijede ovaj odnos imaju istu viskoznost pri niskim i visokim brzinama smicanja i nazivaju se Newtonovim fluidima (18). Primjeri Newtonovih fluida su voda, zrak i alkohol. No, mnoge složene tekućine, sustavi i polimerne otopine ne pokazuju Newtonovo ponašanje, već im se viskoznost mijenja pod utjecajem smicanja. Takve se tekućine nazivaju ne-Newtonovi fluidi, a primjer su pasta, šampon ili jogurt (19).

Drugi bitan pojam u reologiji je elastičnost. Ona se može opisati kao sklonost čvrstog materijala da se privremeno deformira kada je pod utjecajem sile i vraća svoj izvorni oblik i veličinu nakon uklanjanja naprezanja (20). Svojstvo koje se pojavljuje kod mnogih ne-Newtonovih fluida je viskoelastičnost. Ovo se svojstvo može opisati kao kombinacija elastičnog, koje se javlja kod čvrstih tvari, i viskoznog, koje se javlja kod fluida, kada su pod utjecajem naprezanja (21). Tvari koje imaju viskoelastična svojstva, mogu se ponašati kao fluidi, tj. teći u određenim uvjetima te se vratiti u svoje početno stanje u drugim uvjetima.

Viskoelastičnost proizlazi iz interakcije između komponenti u tekućini, kao što su polimerni lanci, čestice i kapljice (17).

1.3.1 Reologija otopina natrijeva hijaluronata

Reologija je vrlo važna u razumijevanju suznog filma, tj. pravih i umjetnih suza tijekom cijelog ciklusa treptanja u kojem dolazi do promjena kako bi se učinkovito vlažila površina oka, zadržala vlaga, te pružila zaštita od prašine, bakterija itd. Umjetne suze se mogu klasificirati u dvije glavne reološke kategorije, Newtonove i ne-Newtonove. Newtonovo ponašanje je praćeno konstantnom viskoznošću kao funkcijom smične brzine, dok se ne-Newtonovo ponašanje može prikazati u tri faze (Slika 3). Prva faza je Newtonovo ponašanje opisano platoom pri vrlo niskoj smičnoj brzini gdje vrijedi $\eta = \eta_0$ (viskoznost bez smicanja). Kod umjetnih i ljudskih suza ova faza je prisutna u otvorenom oku, između ciklusa treptanja, kada suzni film miruje. U ovoj fazi poželjna je visoka viskoznost suza kako bi se izbjegla drenaža i razbijanje suznog filma. Druga faza je smično stanjivanje (*shear thinning*). Događa se s promjenom brzine kretanja kapaka, odnosno treptanjem. Tada dolazi do sve većeg pritiska na suzni film kako se treptanje ubrzava, postupno smanjujući viskoznost suznog filma kako bi se omogućilo širenje suza po površini oka, čime se izbjegava oštećenje površine epitela. Na kraju, treća faza, koja predstavlja drugi Newtonov plato pri visokim brzinama smicanja, gdje vrijedi $\eta = \eta_\infty$ (viskoznost tankog filma nastalog pri ubrzanju treptaja). Mjerenje reoloških svojstava umjetnih suza trebalo bi se ispitivati u širokom rasponu brzina smicanja (reološki profil) kako bi se dobilo što više informacija o njihovom ponašanju u složenom sustavu suza u prirodnom okruženju (Slika 3.) (18).



Slika 2.: Ovisnost viskoznosti Newtonovih i ne-Newtonovih fluida o brzini smicanja primijenjeno na treptanje oka (18)

Također, još jedno važno svojstvo kod suza je elastičnost. Ona je bitna kako bi se suze brzo vratile u svoje inicijalno fizičko stanje prije sljedećeg treptanja. Na taj način se povećava udobnost i vrijeme zadržavanja na oku. Zbog toga bi idealne umjetne suze trebale biti viskoelastične, što im omogućuje širenje po rožnici u tankom prozirnomo sloju sa svakim treptajem, te nakon toga brzo vraćanje u stanje prije treptanja kako bi bile spremne za sljedeći treptaj (18).

1.3.2. Reološka karakterizacija pomoću reometra

Reometar je uređaju koji mjeri odnos naprezanja i deformacije kako bi se razumjela svojstva tečenja, točnije deformacije materijala (22). Ima nekoliko mjernih sustava, ali za mjerenje otopina natrijeva hijaluronata koristi se mjerni sustav „*cone and plate*” (CP). Ovaj sustav sastoji se od gornjeg mjernog tijela, tj. „*cone*” te donjeg mjernog tijela, tj. „*plate*”. Kut između površina ova dva mjerna tijela ovisi o vrsti testa koji se izvodi i najčešće je oko 1-2 stupnja (23).

Reometar mjeri ovisnost viskoznosti o brzinama smicanja (24). Ovim se mjerenjem dobivaju informacije o ponašanju otopine tijekom smicanja što emitira prirodni ciklus treptanja oka (25).

1.3.3. Reološke metode u farmaceutskoj industriji

Reološka karakterizacija je vrlo bitna u farmaceutskoj industriji zato što reološka svojstva mogu značajno utjecati na kvalitetu i djelotvornost proizvoda. Ovakva se karakterizacija odnosi na istraživanje tečenja materijala i ponašanje, tj. deformaciju. Zajedno s viskoznošću formulacije, elastičnošću i plastičnošću, reološko ponašanje može utjecati na procese proizvodnje, izgled, dugoročnu stabilnost, doziranje, senzorska svojstva i *in vivo* učinak. Reološka mjerenja mogu dati i informacije o varijabilnosti proizvedenih serija te terapijskoj učinkovitosti. Također, pružaju uvid u stabilnost otopine se te pomoću njih može odrediti postoji li značajan utjecaj na mikrostrukturu proizvoda ovisno o načinu primjene proizvoda. Biofarmaceutske karakteristike, kao što je otpuštanje lijeka i apsorpcija, također ovise o reološkom profilu formulacije (26). Postoji više čimbenika, široko opisanih u literaturi, koji utječu na mikrostrukturu te pri čemu reološke karakteristike igraju nepobitnu ulogu. Iz tog razloga Europska agencija za lijekove (EMA) je predstavila specifične zahtjeve koji se tiču reoloških parametara koji se trebaju postići dok se opisuje reološko ponašanje određene formulacije (27,28).

1.4. Mukoadhezija

U kasnim 80-tim te ranim 90-tim povećalo se zanimanje i razvoj mukoadhezivnih formulacija u farmaceutskoj industriji. Ove su formulacije produljile postojanost lijeka na sluznici (mukozi), poboljšale djelovanje i apsorpciju te bioraspoloživost lijeka, a time i njegovu terapijsku učinkovitost. Mukoadhezija se može opisati kao privlačna sila između biološkog materijala i mukoze ili mukozne membrane (29).

Smatra se rezultatom dviju faza. U prvoj fazi, uspostavljen je kontakt između mukoadhezivnog materijala i biološkog supstrata. Ovdje ključnu ulogu igraju sposobnost materijala da se širi na biološki supstrat i međufazne sile koje se stvaraju između mukoadhezivnog materijala i supstrata. U drugoj fazi, stvaraju se fizičkih zapleti i sekundarne kemijske veze između mukoadhezivnog materijala i sluzi (mukoze). U slučaju polimernih materijala, takvoj fazi prethodi međusobno prožimanje polimernih lanaca i glikoproteina mucina, koji su glavne komponente sluzi (30). Tijekom te druge faze dolazi do jačanja mukoadhezivnog sučelja. Takvo sučelje se može zamisliti kao sloj sluzi „pomiješan” s mukoadhezivnim materijalom (29).

Kemijski sastav mucina je heterogena mješavina glikoproteina velike molekulske mase i neglikoziliranih domena bogatih cisteinom. Glikani su kovalentno povezani četkasti oligosaharidi s prosječno 8-10 jedinica. Disulfidni mostovi javljaju se između domena bogatih cisteinom i generiraju umreženi trodimenzionalni polimerni gel (26). Mukoadhezivni polimeri imaju brojne hidrofilne skupine, kao što su hidroksilna, karboksilna, amidna i sulftana. Te se skupine vežu na sluznicu ili staničnu membranu vodikovim vezama, hidrofobnim ili elektrostatskim interakcijama. Hidrofilne skupine, također uzrokuju i bubrenje polimera u vodi. Na mukoadheziju nekog spoja mogu utjecati brojni faktori, uključujući hidrofilnost, molekulsku masu, *cross-linking*, bubrenje, pH i koncentraciju aktivnog polimera (31).

1.4.1. Tehnika za određivanje mukoadhezije

Reološke tehnike koje proučavaju tečenje i deformaciju materijala pri primjeni sile (smicanje) koriste se za predviđanje mukoadhezivnih svojstava polimernih formulacija (31). Pomoću takvih tehnika razmatraju se reološke promjene otopine polimera prije i nakon miješanja s mucinom kao provjera pojave mukoadhezivne interakcije. Prema takvom pristupu, reološke promjene proizlaze iz iste fizikalno-kemijske interakcije koje se mogu dogoditi tijekom mukoadhezije. Godine 1990. Hassan i Gallo, prvi u

ovom području, predložili su sinergističko povećanje viskoznosti uočeno kada se polimer pomiješa s mucinom. Kao indeks čvrstoće mukoadhezivne veze predložili su sljedeću jednadžbu:

$$\eta_t = \eta_m + \eta_p + \Delta\eta \quad [4]$$

Gdje je η_t viskoznost otopine u kojoj su pomiješani polimer i mucin, η_m je viskoznost otopine mucina, η_p je viskoznost otopine polimera, $\Delta\eta$ je komponenta bioadhezije, koja predstavlja razliku između viskoznosti otopine u kojoj su pomiješani mucin i uzorak, i zbroja viskoznosti samog uzorka i samog mucina. Na viskoznost smjese mucina i polimera mogu utjecati viskoznost otopine mucina, viskoznost otopine polimera i viskoznost komponente koja nastaje kao rezultat interakcije između polimera i mucina, što je izravna procjena jačine bioadhezije. Takva komponenta označena je pojmom „relativni reološki sinergizam“, koji se koristi za procjenu mukoadhezivnog potencijala polimera i tekućih formulacija (29).

2. CILJ RADA

Tema ovog rada je mukoadhezija farmaceutskih otopina koje sadrže natrijev hijaluronat, te kako maseni udjeli i molekulske mase natrijevog hijaluronata utječu na mukoadheziju otopina.

U svrhu toga ispitale su se sljedeće hipoteze:

1. Vrsta i maseni udio natrijeva hijaluronata te osmolalnost otopine utječu na reološke karakteristike otopine koje sadrže natrijev hijaluronat.
2. Vrijeme i temperatura od 50 °C utječu na reološke karakteristike otopine koje sadrže natrijev hijaluronat.
3. Promjena molekulske mase (duljine lanca) i masenog udjela natrijeva hijaluronata te osmolalnosti utječu na mukoadheziju otopina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izradu otopina koje sadrže natrijev hijaluronat korištena su tri natrijeva hijaluronata (Bloomage Biotechnology Corp., Ltd., Kina), različitih intrinzičnih viskoznosti (molekulskih masa): 0,6 m³/kg (244 kDa), 1,7 m³/kg (980 kDa), te 2,3 m³/kg (1420 kDa). Također, za pripremu otopina korišten su još natrijev klorid (Kemika D.D., Hrvatska), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Merck KGaA, Njemačka), dinatrijev fosfat bezvodni (Merck KGaA, Njemačka), konzervans benzalkonijev klorid 50% otopina (Novo Nordisk Pharmatech A/S, Danska), u radu će se dalje spominjat kao BAK. Za pripremu svih otopina korištena je pročišćena voda. Za mukokadhezijski test koristio se svinjski želučani mucin u prahu, tip II (SIGMA-ALDRICH, Co., SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema otopina

Otopine su se pripremale tako da se u pročišćenu vodu dodao natrijev klorid, natrijev hijaluronat, natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, dinatrijev fosfat bezvodni i BAK uz konstantno miješanje na miješalici do potpunog otapanja natrijeva hijaluronata. Natrijev hijaluronat manje intrinzične viskoznosti, tj. kratko lančani se otopio brže (nakon 40 minuta), dok natrijevom hijaluronatu većih intrinzičnih viskoznosti, tj. dugo lančanom je trebalo i do 4 sata do potpunog otapanja. Za svaki od tri natrijeva hijaluronata pripremljene su otopine s različitim masenim udjelima natrijeva hijaluronata: 0,21%, 0,4% i 0,6%. Svaka od tih devet otopina pripremljena je s tri različita masena udjela natrijeva klorida; s 0,208%, 0,830% te 1,66% kako bi se pratila svojstva otopina kad su hipotonične, izotonične te hipertonične. U Tablici 1. prikazana je matrica pripremljenih otopina. Budući da je danas trend razvijanje formulacija bez konzervansa, pripremljena je i jedna otopina s natrijevim hijaluronatom intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg, masenog udjela 0,4% bez dodatka BAK-a kako bi se

provjerio utjecaj BAK, odnosno njegovog odsustva na svojstva otopina bez konzervansa.

Kako bi se utvrdilo djelovanje mikroorganizama prisutnih u pripremljenim otopina uz prisutnost konzervansa (BAK) pripremljena je i jedna otopina s natrijevim hijaluronatom intrinzične viskoznosti 1,7 m³/kg, masenog udjela 0,4% bez BAK-a, koja je sterilno filtrirana (uklonjeni su mikroorganizmi iz otopine).

Svaka pripremljena otopina raspunjena je u tri bočice po 250 mL. Na jednoj su bočici provedena mjerenja parametara neposredno nakon izrade (interval T0). Druge dvije bočice su stavljene na uvjete ubrzanog starenja na temperaturu 50 °C u komori za stabilnost. Jedna bočica povukla se s uvjeta ubrzanog starenja nakon 1,5 mjeseci (interval T1,5), a druga nakon 3 mjeseca (interval T3). Nakon povlačenja s uvjeta ubrzanog starenja tijekom mjerenja definiranih parametara uzorci su se čuvali na temperaturi od 18-21°C. Prije samog mjerenja svi uzorci su temperirani jedan sat na temperaturi laboratorija.

Tablica 1. Intrinzične viskoznosti (IV) i maseni udjeli natrijevog hijaluronata (NaHA) te maseni udio natrijevog klorida u pripremljenim otopinama

IV(NaHA) (m ³ /kg)	0,6			1,7			2,3			w (NaCl) (%)
w(NaHA) (%)	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,208
	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,830
	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	1,66

3.2.2. Mjerenje pH

pH svake otopine izmjeren je pomoću pH-metra (SevenExcellence pH meter S400, Mettler Toledo, Švicarska) te je mjerenje ponovljeno tri puta za svaku otopinu. Kao konačna vrijednost uzela se srednja vrijednost tri mjerenja. pH otopine mjerio se odmah nakon izrade otopine (T0), nakon

1,5 mjeseca (T1,5) i nakon 3 mjeseca (T3) na uvjetima ubrzanog starenja na temperaturi 50 °C.

3.2.3. Mjerenje osmolalnosti

Za mjerenje osmolalnosti otopina korišten je osmometar (Osmomat Gonotec 030-D, Njemačka) s pripadajućim računalnim programom za obradu podataka. Za jedan uzorak provedena su tri mjerenje te se kao konačan rezultat uzela srednja vrijednost ta tri rezultata. Mjerenje se radilo u intervalima T0, T1,5 i T3.

3.2.4. Mjerenje viskoznosti

Viskoznost otopina mjerila se pomoću viskozimetra (Brookfield LV DV-II+ Pro, Kanada) i pripadajućeg računalnog programa za obradu podataka. Vreteno i brzina vrtnje vretena izabere se tako da mjerenje bude unutar mjernog područja viskozimetra (između 20% i 80% okretnog momenta² (*torque*)). Prvo se odredila smična brzina (*shear rate*) koja se smatra kritičnom kod proizvoda koji se ispituje, te se onda odabralo vreteno i brzina vrtnje vretena kojima se približno postiže ta smična brzina. Za mjerenje pripremljenih otopina je odabrano vreteno za UL Adapter (UL-Y) koje se koristi za uzorke niže viskoznosti. Temperatura na kojoj se provodilo mjerenje je 32 °C. Mjerenje se ponavljalo dva puta te se uzela njihova srednja vrijednost kao konačan rezultat. Kod mjerenja viskoznosti očekivana je veća varijabilnost radi brojnih faktora koji mogu utjecati na mjerenje. Ako su mjerenja odstupala od srednje vrijednosti više od 5%, radilo se i treće mjerenje te računala srednja vrijednost ta tri mjerenja. Dobiveni rezultati su iskazani u jedinici mPas. Viskoznost se određivala u intervalima T0, T1,5 i T3.

3.2.5. Reološko mjerenje

Za reološko mjerenje otopina korišten je reometar (Reometar MCR 120, Anton Paar GmbH, Austrija). Za mjerenje i obradu podataka koristio se računalni program RheoCompass. Mjerni sustav koji se koristio je bio „cone/plate“ (CP) sustav. Točnije, koristio se CP 50-1 (gdje je promjer gornjeg i donjeg mjernog tijela 50 mm, a kut stošca $\alpha = 1^\circ$). Za svaku otopinu mjerenje se ponavljalo dva puta, a temperatura je bila postavljena na 32 °C. Mjerenje se radilo u intervalima T0, T1,5 i T3.

Rezultat mjerenja je krivulja ovisnosti viskoznosti (η) o smičnoj brzini ($\dot{\gamma}$). Ona prikazuje kako se uzorak ponaša, tj. koje su mu vrijednosti viskoznosti pri različitim brzinama smicanja ($\dot{\gamma}$). Krivulja viskoznosti se određuju prema formuli:

$$\eta [Pas] = \frac{\tau [Pa]}{\dot{\gamma} [s^{-1}]} \quad [5]$$

gdje τ je smicanje.

3.2.6. Mjerenje površinske napetosti

Za mjerenje površinske napetosti otopina koristio se optički tenziometar (Attension Theta Flex, Švedska) s odgovarajućim računalnim programom za obradu podataka OneAttension. Kod mjerenja površinske napetosti za gustoću se uzimala vrijednost od 1 g/cm³, zato što je najveći udio otopine voda, dok se za viskoznost uzimala vrijednost izmjerena za svaki uzorak. Pomoću optičkog tenziometra snima se kapljica. Obradom te slike određuje se kontaktni kut te se iz Young-Laplaceove jednadžbe izračunava površinska napetost. Svako se mjerenje ponavljalo dva puta i uzeta je srednja vrijednost. Mjerenje se radilo u intervalima T0, T1,5 i T3.

3.2.7. Mukoadhezivni test

Test mukoadhezije ispitivao se na otopinama pripremljenim sa tri hijaluronata različitih intrinzičnih viskoznosti: 0,6 m³/kg, 1,7 m³/kg te 2,3 m³/kg, istog masenog udjela natrijeva hijaluronata (0,4%) i istog masenog

udjela natrijeva klorida (0,83%). Kako bi se ispitaio i utjecaj različitih masenih udjela hijaluronata dodatno su pripravljene otopine s masenim udjelom natrijeva hijaluronata od 0,21 % i 0,6 % gdje se koristio hijaluronat jedne intrinzične viskoznosti (1,7 m³/kg) s jednim masenim udjelom natrijevog klorida (0,83%). Dodatno, kako bi se ispitaio utjecaj natrijeva klorida (osmolanosti) na mukoadheziju pripravljene su otopine natrijeva hijaluronata, masenog udjela 0,4%, intrinzične viskoznosti 1,7 m³/kg, i s 0,208% i 1,66% natrijeva klorida.

Prije mjerenja otopine su razrijeđene 50% sa pročišćenom vodom (otopina uzorka), i sa 6% otopinom mucina (otopina smjese uzorka i mucina). Osnovna otopina mucina (10%) pripremila se u pročišćenoj vodi uz podešavanje pH na 6.2 sa 0,5 M NaOH. Razrijeđene otopine mucina (3% i 6%) pripremile su se razrjeđivanjem osnovne otopine u pročišćenoj vodi. Reološki se mjerila otopina 3% mucina (otopina mucina). Za svaku otopinu provodilo se mjerenje na reometru pod istim uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.5. Reološko mjerenje. Za test mukoadhezije potrebno je reološko mjerenje otopine uzorka, otopine mucina te otopine u kojoj su pomiješane otopina mucina i otopina uzorka.

Kvantificira se viskoznost nulte smične brzine za svaku pripravljenu otopinu jer se smatra da su vrijednosti viskoznosti pri niskim brzinama smicanja najrelevantnije mukoadhezijskom ponašanju - najsličnije su viskoznosti proizvoda u mirovanju i početnom kontaktu s površinom oka (mucinom). Za izračun parametara reološkog sinergizma koji ukazuje na mukoadhezijska svojstva koristile su se formule:

$$\Delta\eta = \eta(\text{otopina mucina i uzorka}) - (\eta(\text{uzorak}) + \eta(\text{mucin})) \quad [6]$$

$$\frac{\Delta\eta}{\eta} + 1, \text{ gdje je } \eta = \eta(\text{uzorak}) + \eta(\text{mucin}) \quad [7]$$

$\Delta\eta$ predstavlja razliku između stvarnih vrijednosti viskoznosti uzorka pomiješanih s mucinom i teorijskih vrijednosti. Teorijske vrijednosti definirane su kao zbroj vrijednosti viskoznosti uzorka i mucina kad se analiziraju pojedinačno. $\Delta\eta/\eta+1$ opisuje relativni reološki sinergizam, tj.

izražava relativno povećanje viskoznosti s obzirom na sam uzorak i mucin. Sva mjerenja provodila su se dva puta, te se uzela srednja vrijednost za računanje relativnog reološkog sinergizma, a u slučajevima odstupanja dobivenih vrijednosti više od 25% provelo se i treće mjerenje. Dalje u izračunu relativnog reološkog sinergizma koristila se srednja vrijednost svih provedenih mjerenja.

4. REZULTATI

Rezultati mjerenja za tri intervala mjerenja, T0 odmah nakon izrade otopine, T1,5 nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50°C tijekom 1,5 mjeseci te T3 nakon stajanja 3 mjeseca na istom uvjetu prikazani su u nižim tablicama. Mjereni su pH, osmolalnost, površinska napetosti, viskoznost i reologija u sva tri intervala. Rezultati mjerenja u svim otopinama sa 0,208%, 0,83% i 1,66% natrijeva klorida prikazani su redom u tablicama 1., 2. i 3.

Tablica 2.: Rezultati mjerenja pH, osmolalnosti, površinske napetosti i viskoznosti otopina pripremljenih s tri natrijeva hijaluronata (NaHA) različitih intrinzičnih viskoznosti (0,6 m³/kg; 1,7 m³/kg; 2,3 m³/kg), svaki s tri masena udjela (0,21%; 0,4%; 0,6%); uz maseni udio natrijeva klorida od 0,208%; parametri su se mjerili u tri vremenske točke, neposredno nakon izrade (T0), te nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50°C 1,5 mjeseci (T1,5) i 3 mjeseca (T3)

IV (NaHA) (m³/kg)	0,6	0,6	0,6	1,7	1,7	1,7	2,3	2,3	2,3
w (NaHA) (%)	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6
	Mjerenje u T0 intervalu								
pH	7,0	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,101	0,102	0,101	0,098	0,101	0,105	0,096	0,099	0,103
Površinska napetost (mN/m)	44,4	45,6	46,3	44,5	45,2	43,5	43,8	45,7	47,2
Viskoznost (mPas)	2,99	6,02	11,1	12,3	57,2	250	35,3	235	1380
	Mjerenje u T1,5 intervalu								
pH	7,1	7,0	7,0	7,1	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,103	0,103	0,110	0,100	0,104	0,106	0,103	0,104	0,104
Površinska napetost (mN/m)	45,6	45,6	48,5	44,3	45,5	46,3	43,6	45,1	46,5
Viskoznost (mPas)	2,52	4,95	8,95	8,43	31,7	101	17,8	87,1	346
	Mjerenje u T3 intervalu								
pH	7,1	7,1	7,0	7,1	7,1	7,1	7,0	7,1	7,0
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,103	0,103	0,106	0,100	0,104	0,106	0,100	0,103	0,105
Površinska napetost (mN/m)	43,9	47,2	48,2	43,7	45,5	46,6	43,4	44,0	46,5
Viskoznost (mPas)	2,21	3,89	8,53	6,35	20,8	54,1	13,1	47,8	314

Tablica 3.: Rezultati mjerenja pH, osmolalnosti, površinske napetosti i viskoznosti otopina pripremljenih s tri natrijeva hijaluronata (NaHA) različitih intrinzičnih viskoznosti (0,6 m³/kg; 1,7 m³/kg; 2,3 m³/kg), svaki s tri masena udjela (0,21%; 0,4%; 0,6%); uz maseni udio natrijeva klorida od 0,83%; parametri su se mjerili u tri vremenske točke, neposredno nakon izrade (T0), te nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50°C 1,5 mjeseci (T1,5) i 3 mjeseca (T3)

IV (NaHA) (m³/kg)	0,6	0,6	0,6	1,7	1,7	1,7	2,3	2,3	2,3
w (NaHA) (%)	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6
	Mjerenje u T0 intervalu								
pH	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,298	0,297	0,305	0,299	0,302	0,303	0,298	0,301	0,322
Površinska napetost (mN/m)	44,2	40,1	39,0	41,4	41,0	41,2	41,9	44,1	42,5
Viskoznost (mPas)	2,89	4,94	9,78	9,92	49,0	184	25,8	192	1332
	Mjerenje u T1,5 intervalu								
pH	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,302	0,302	0,305	0,306	0,306	0,317	0,298	0,303	0,298
Površinska napetost (mN/m)	43,2	40,0	36,8	40,8	45,8	44,8	45,6	47,7	45,6
Viskoznost (mPas)	2,70	4,10	9,00	5,42	27,1	98,6	15,0	64,0	349
	Mjerenje u T3 intervalu								
pH	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,302	0,303	0,304	0,295	0,302	0,307	0,293	0,305	0,302
Površinska napetost (mN/m)	41,2	37,5	39,0	41,8	43,9	44,1	43,6	42,3	48,0
Viskoznost (mPas)	2,02	3,36	5,88	3,77	15,2	40,7	7,99	29,3	91,6

Tablica 4.: Rezultati mjerenja pH, osmolalnosti, površinske napetosti i viskoznosti otopina pripremljenih s tri natrijeva hijaluronata (NaHA) različitih intrinzičnih viskoznosti (0,6 m³/kg; 1,7 m³/kg; 2,3 m³/kg), svaki s tri masena udjela (0,21%; 0,4%; 0,6%); uz maseni udio natrijeva klorida od 1,66%; parametri su se mjerili u tri vremenske točke, neposredno nakon izrade (T0), te nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50°C 1,5 mjeseci (T1,5) i 3 mjeseca (T3)

IV (NaHA) (m³/kg)	0,6	0,6	0,6	1,7	1,7	1,7	2,3	2,3	2,3
w (NaHA) (%)	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6	0,21	0,4	0,6
	Mjerenje u T0 intervalu								
pH	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,562	0,570	0,570	0,560	0,569	0,573	0,561	0,571	0,571
Površinska napetost (mN/m)	36,8	36,1	36,4	38,4	36,4	41,1	38,2	37,4	44,9
Viskoznost (mPas)	2,32	4,57	8,70	9,05	40,2	157	21,6	173	1011
	Mjerenje u T1,5 intervalu								
pH	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,567	0,564	0,585	0,574	0,568	0,568	0,567	0,570	0,572
Površinska napetost (mN/m)	38,1	36,7	36,4	38,7	38,0	35,0	38,9	38,0	41,8
Viskoznost (mPas)	2,05	3,62	5,35	4,93	20,5	34,8	7,25	32,2	205
	Mjerenje u T3 intervalu								
pH	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,557	0,563	0,585	0,574	0,573	0,572	0,572	0,569	0,572
Površinska napetost (mN/m)	39,3	35,1	40,5	37,3	36,5	40,4	38,0	36,9	41,2
Viskoznost (mPas)	1,89	3,20	5,09	4,49	12,5	30,1	6,17	26,0	93,6

4.1. pH, osmolalnost i površinska napetost

pH svih otopina je u rasponu od 6,8 do 7,1 te ostaje isti nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi od 50 °C 1,5 mjeseci kao i nakon tri mjeseca.

Na osmolalnost otopina u najvećoj mjeri je utjecala dodan maseni udio natrijevog klorida dok promjena vrste natrijevog hijaluronata niti masenog udjela natrijevog hijaluronata nije značajno utjecala na osmolalnost. Sa

0,208% natrijeva klorida otopina je hipotonična, a osmolalnost je u rasponu od 0,096 do 0,110 Osmol/kg. Otopine s 0,83% natrijeva klorida imaju osmolalnost u izotoničnom rasponu od 0,293 do 0,322 Osmol/kg. Osmolalnost otopina s 1,66% natrijeva klorida je hipertonična u rasponu od 0,557 do 0,585 Osmol/kg. Stajanje na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi od 50 °C također nema utjecaja na osmolalnost ni nakon tri mjeseca.

Srednja vrijednost (uključujući mjerenja na svim intervalima) površinske napetost za hipotonične otopine je 45,41 mN/m, u rasponu 43,5 - 48,5 mN/m, za izotonične otopine je 42,48 mN/m, u rasponu 36,0 - 47,9 mN/m, a za hipertonične je 38,24 mN/m, u rasponu 36,1 - 44,9 mN/m. Variranje masenog udjela i vrste hijaluronata nije imalo značajnog utjecaja na površinsku napetost, kao ni starenje na uvjetu povišene temperature (Tablica 1. - 3.).

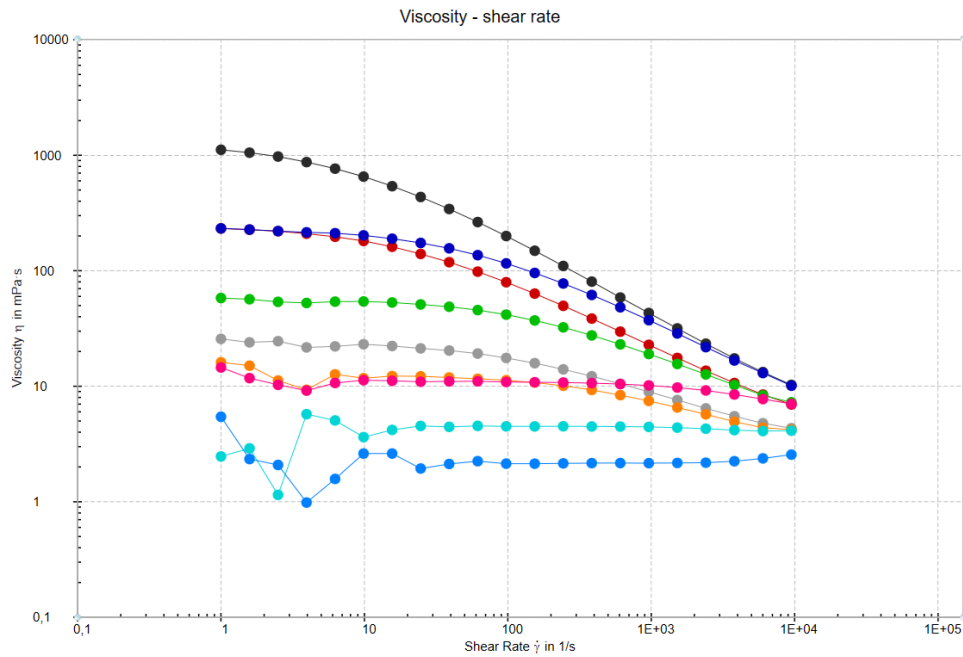
4.2. Viskoznost i krivulje ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja

Svakoj otopini izmjerena je viskoznost pomoću viskozimetra te je pomoću reometra izmjerena krivulja viskoznosti koja prikazuje odnos viskoznosti i brzine smicanja. Rezultati mjerenja viskoznosti prikazani su u Tablicima 2. - 4. Viskoznost otopina raste s porastom intrinzične viskoznosti natrijeva hijaluronata. Također, viskoznost otopina raste i s porastom masenog udjela natrijeva hijaluronata u otopini. Krivulje ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja (reološki profili) prikazane su na Slikama 3. - 11. Svim otopinama natrijeva hijaluronata intrinzičnih viskoznosti 1,7 m³/kg i 2,3 m³/kg viskoznost opada s brzinom smicanja, dok otopinama natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg viskoznost ostaje konstantna s povećanjem brzine smicanja.

Na početku krivulje otopina manjih viskoznosti vidljiva je varijabilnost viskoznosti, to se događa zato što mjerno tijelo nije prilagođeno za tako niske viskoznosti.

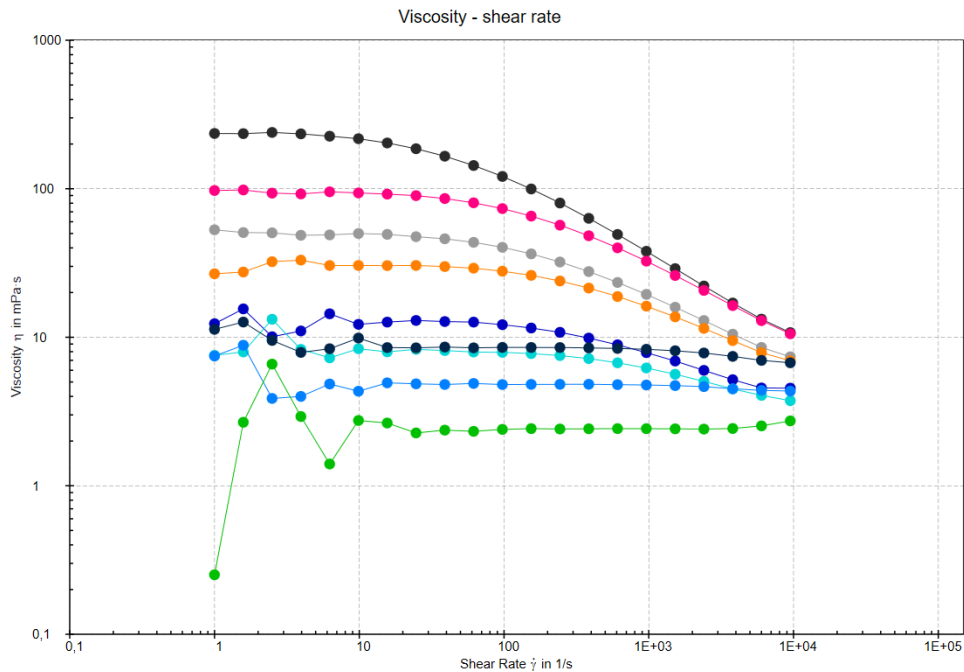
Kako bi se ispitaio utjecaj osmolalnosti otopine na viskoznost pripremljene su otopine natrijeva hijaluronata triju različitih masenih udjela natrijeva klorida, 0,208%, 0,83% i 1,66%. Uspoređujući njihove viskoznosti, vidljivo je da hipotonične otopine imaju najveću viskoznosti, dok s povećanjem osmolalnosti opada viskoznost te to vrijedi za sve ispitane otopine natrijeva hijaluronata (sve vrste i maseni udjeli natrijeva hijaluronata).

Mjerenja viskoznosti nakon stajanja na temperaturi od 50 °C pokazuju da je došlo do pada u viskoznosti s duljim stajanjem na visokoj temperaturi. Isto se događa kod svih otopina neovisno o vrsti i masenom udjelu natrijeva hijaluronata kao i o masenom udjelu natrijeva klorida. Iako starenjem na temperaturi od 50 °C viskoznost opada, reološke karakteristike svih otopina ostaju iste (konstantna viskoznost otopina se natrijevim hijaluronatom intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg, dok kod ostale dvije vrste natrijeva hijaluronata viskoznost opada s povećanjem smične brzine).

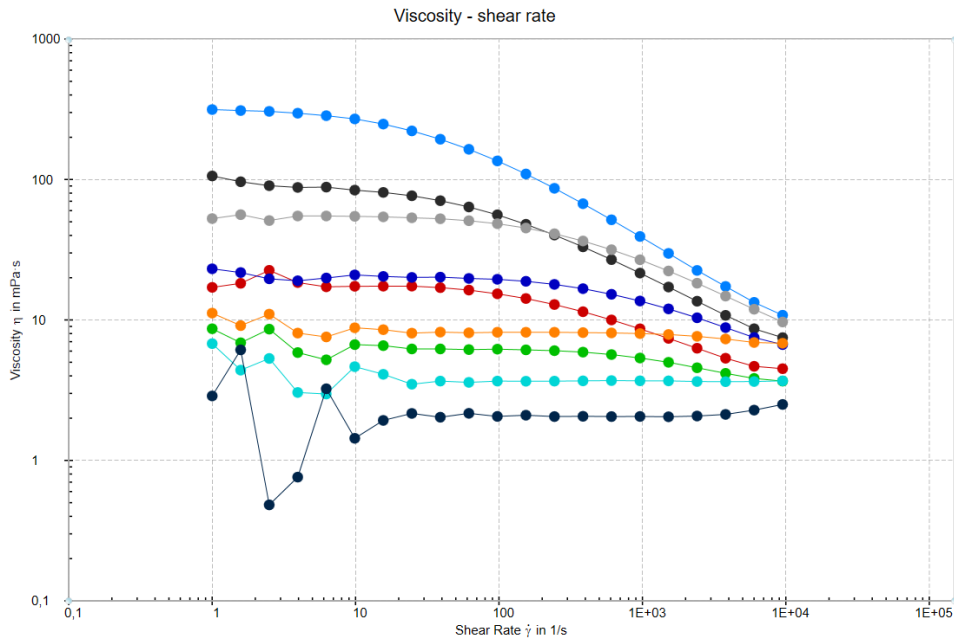


Slika 3.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,208%; mjerenje je provedeno neposredno nakon izrade otopina (T0); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPa·s; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost natrijeva hijaluronata; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata

- IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;

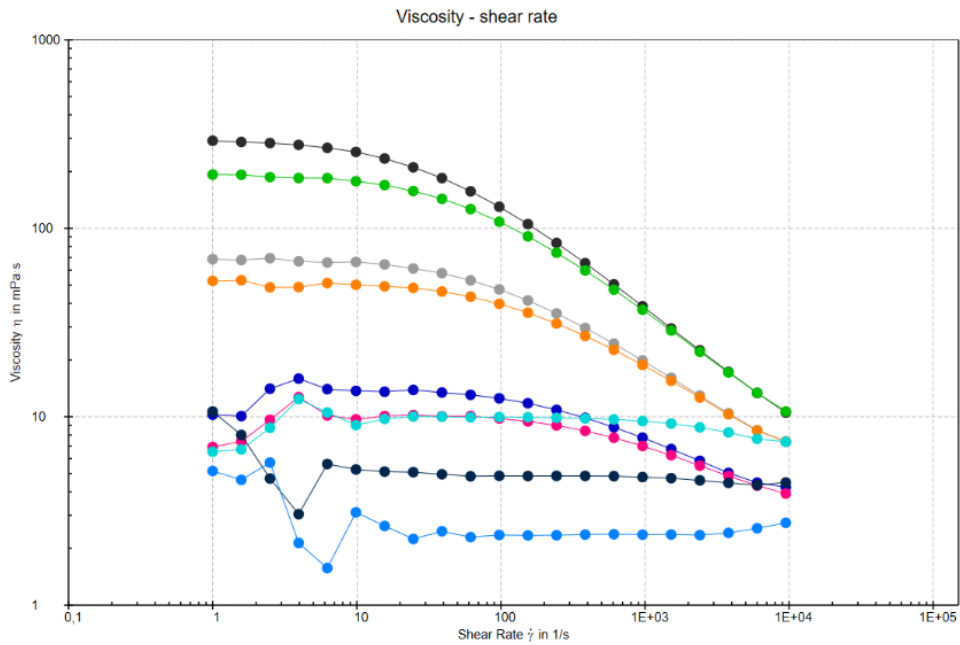


Slika 4.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,208%; mjerenje nakon 1,5 mjeseci stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T1,5); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPas; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;

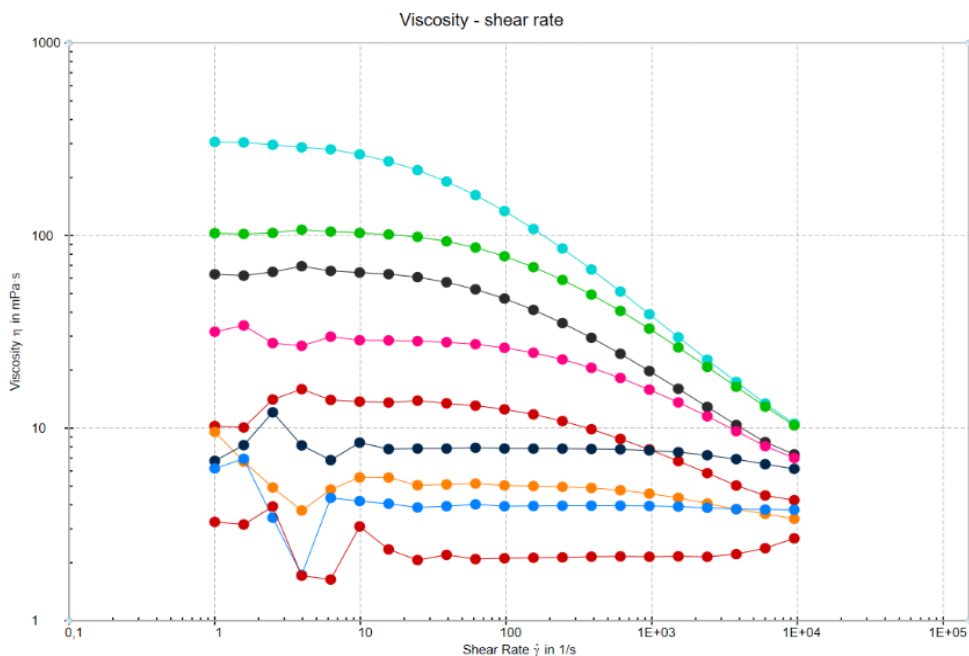


Slika 5.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,208%; mjerenje nakon 3 mjeseca stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T3); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPa s; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost;

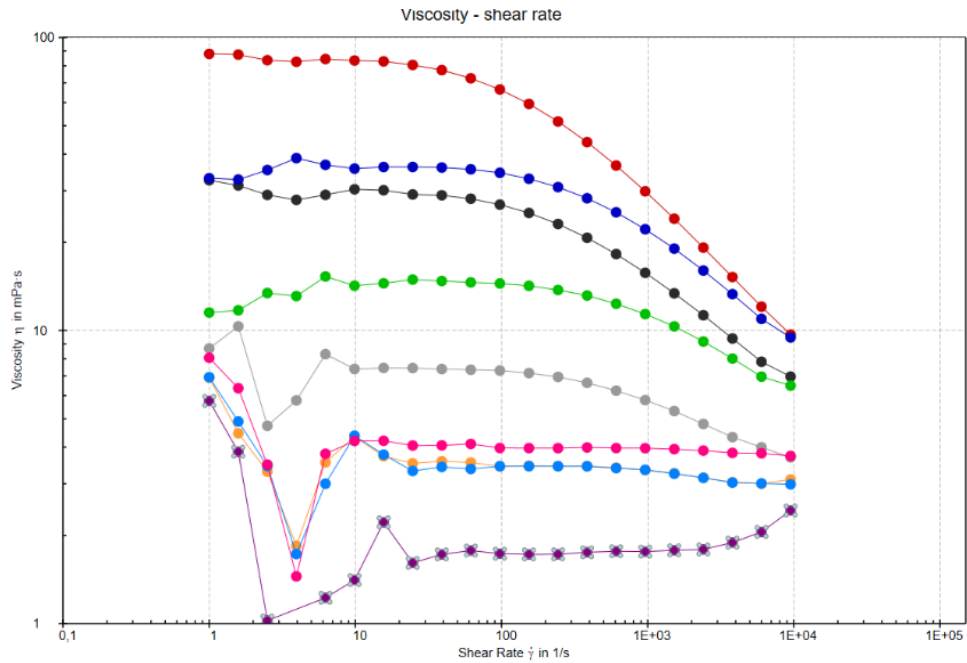
$w(\text{NaHA})$ – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,6\%$; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,4\%$; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,21\%$; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,6\%$; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,4\%$; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,21\%$; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,6\%$; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,4\%$; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, $w(\text{NaHA})=0,21\%$;



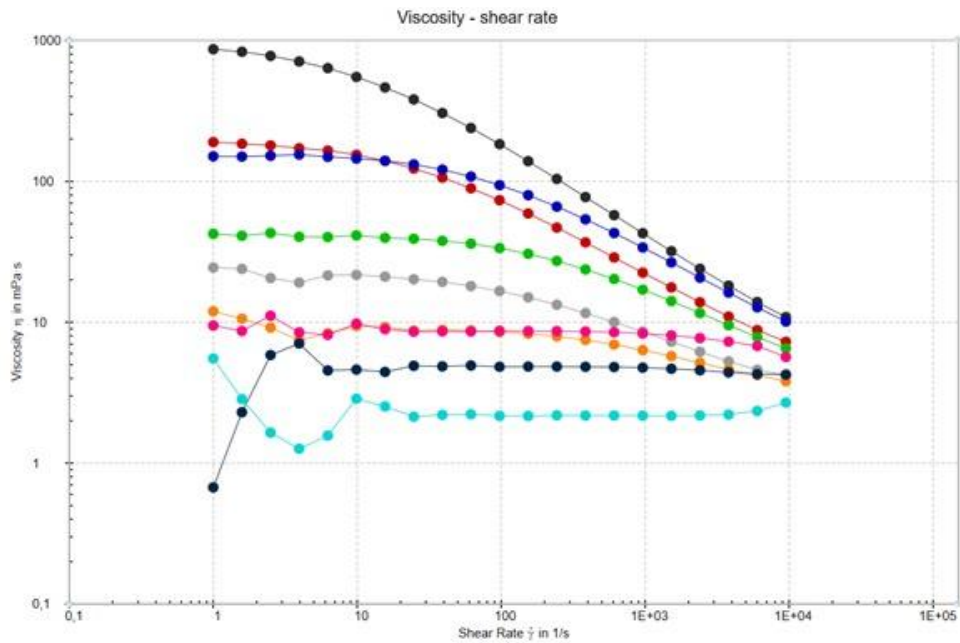
Slika 6.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,83%; mjerenje je napravljeno neposredno nakon izrade otopina (T0); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPas; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;



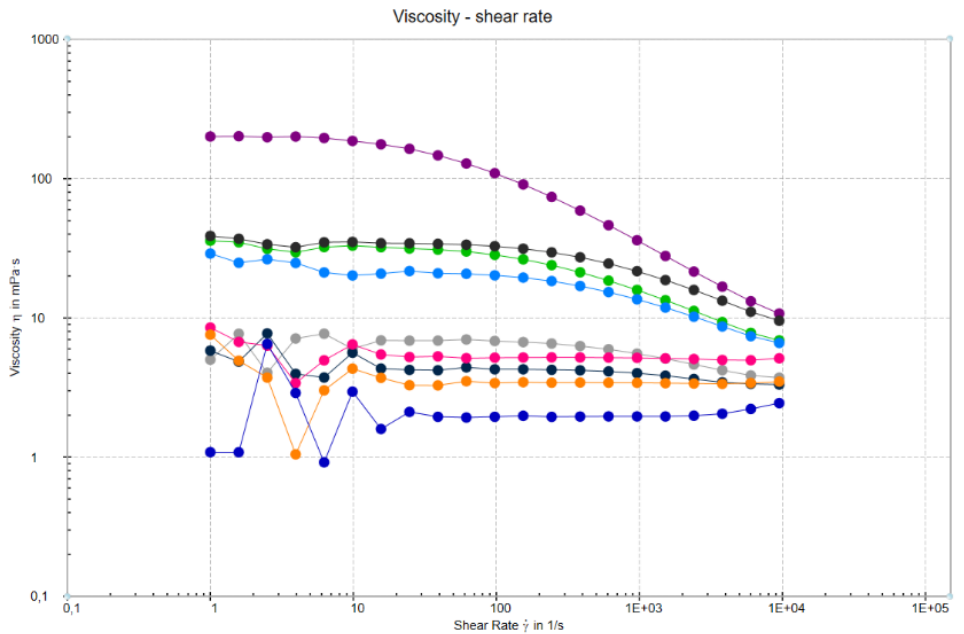
Slika 7.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,83%; mjerenje nakon 1,5 mjeseci stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T1,5); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPas; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) - maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;



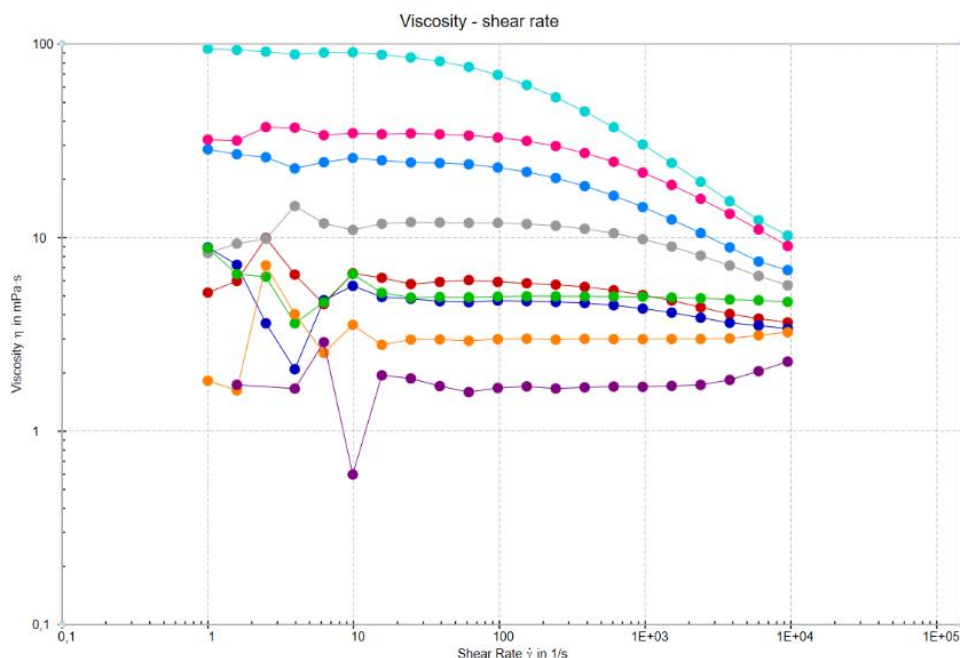
Slika 8.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 0,83%; mjerenje nakon 3 mjeseca stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T3); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPa·s; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) - maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;



Slika 9.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 1,66%; mjerenje je napravljeno neposredno nakon izrade otopina (T0); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPas; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)= 0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)= 0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;



Slika 10.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 1,66%; mjerenje nakon 1,5 mjeseci stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T1,5); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPas; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)= 2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;



Slika 11.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine natrijeva hijaluronata uz konstantni maseni udio natrijeva klorida od 1,66%; mjerenje nakon 3 mjeseca stajanja na uvjetu ubrzanog starenja (T3); na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u 1/s, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPa s; IV(NaHA) - intrinzična viskoznost; w(NaHA) – maseni udio natrijeva hijaluronata; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=2,3 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=1,7 m³/kg, w(NaHA)=0,21%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,6%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,4%; ● IV(NaHA)=0,6 m³/kg, w(NaHA)=0,21%;

4.3. Otopine bez BAK-a

Usporedba rezultata za otopinu pripremljenu bez BAK-a i jednaku otopinu pripremljenu s BAK-om prikazana je u Tablici 5. Vidi se razlika u površinskoj napetosti. Viskoznosti obiju otopina padaju sa stajanjem na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50 °C, dok površinska napetost, osmolalnost i pH ostaju nepromijenjeni.

Tablica 5.: Rezultati mjerenja za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg i masenog udjela natrijeva hijaluronata 0,4% te masenog udjela natrijeva klorida 0,83% pripremljene sa BAK-om i bez BAK-a

	Otopina s BAK-om	Otopina bez BAK-a
	Mjerenje u T0 intervalu	
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,279	0,298

Površinska napetost (mN/m)	40,1	70,0
Viskoznost (mPas)	4,94	4,94
Mjerenje u T1,5 intervalu		
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,302	0,302
Površinska napetost (mN/m)	40,0	70,5
Viskoznost (mPas)	4,10	4,00
Mjerenje u T3 intervalu		
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,303	0,307
Površinska napetost (mN/m)	37,5	71,9
Viskoznost (mPas)	3,36	3,35

Usporedba rezultata za otopinu pripremljenu bez BAK-a i dodatno sterilno filtriranu i jednaku otopinu pripremljenu s BAK-om prikazana je u Tablici 6. Razlika je vidljiva u površinskoj napetosti dok su im viskoznost, osmolalnost i pH gotovo jednaki. U T1,5 vremenu osim u površinskoj napetosti, razlika je vidljiva i u viskoznosti, dok u T3 vremenu razlika u viskoznosti nije značajna.

Tablica 6.: Rezultati mjerenja za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti 1,7 m³/kg i masenog udjela natrijeva hijaluronata 0,4%, uz maseni udio natrijeva klorida od 0,83 % pripremljene sa BAK-om i bez BAK i uz sterilnu filtraciju

	Otopina s BAK-om	Otopina bez BAK-a i sterilno filtrirana
Mjerenje u T0 intervalu		
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,302	0,303
Površinska napetost (mN/m)	41,0	75,0
Viskoznost (mPas)	49,0	47,0
Mjerenje u T1,5 intervalu		
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,306	0,305
Površinska napetost (mN/m)	45,8	74,3

Viskoznost (mPas)	27,1	17,1
	Mjerenje u T3 intervalu	
pH	6,9	6,9
Osmolalnost (Osmol/kg)	0,302	0,300
Površinska napetost (mN/m)	44,0	71,9
Viskoznost (mPas)	15,2	13,5

4.4. Mukoadhezijski test

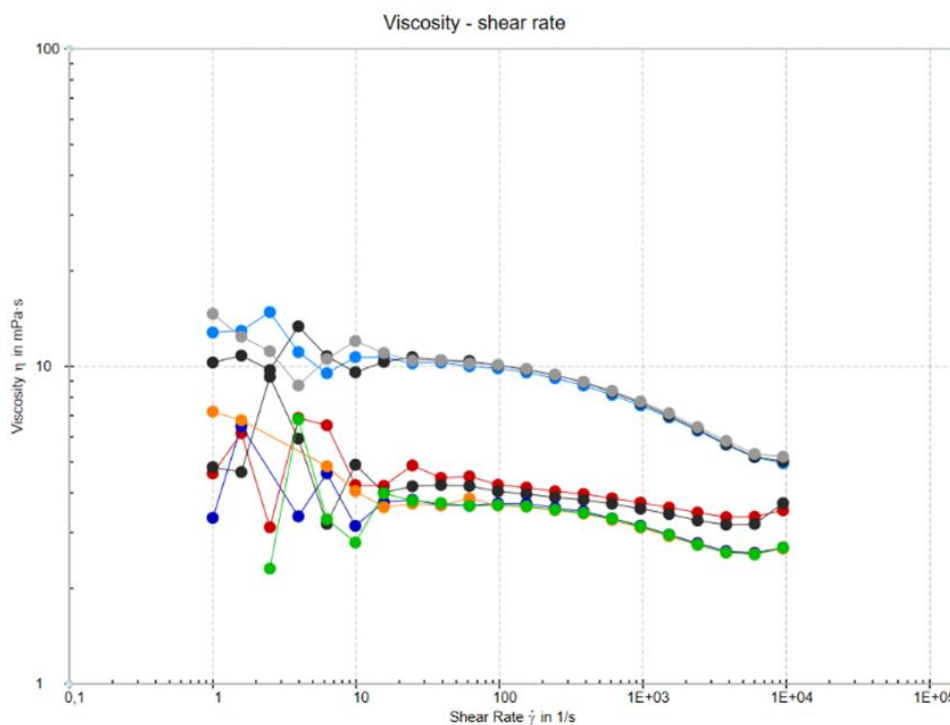
Rezultati relativnog reološkog sinergizma dobiveni mjerenjem na reometru prikazani su u Tablici 7. Na reometru mjerila se otopina uzorka 50% razrijeđena, otopina mucina koncentracije 3% i otopina u kojoj su pomiješani uzorak i mucin u omjeru 50:50. Dobivene krivulje viskoznosti prikazane su na Slikama 12. - 18.

Tablica 7.: Rezultati mukoadhezijskog testa; kao podaci uzete su srednje vrijednosti mjerenja; $\eta(\text{uzorak})$ – viskoznost otopine uzorka razrijeđene 50%; $\eta(\text{mucin})$ – viskoznost 3% otopine mucina; $\eta(\text{mix})$ – viskoznost smjese 6% otopine mucina i uzorka (u omjeru 50:50); $\Delta\eta$ – razlika između viskoznosti otopine smjese mucina i uzorka i zbroja viskoznosti uzorka i viskoznosti mucina

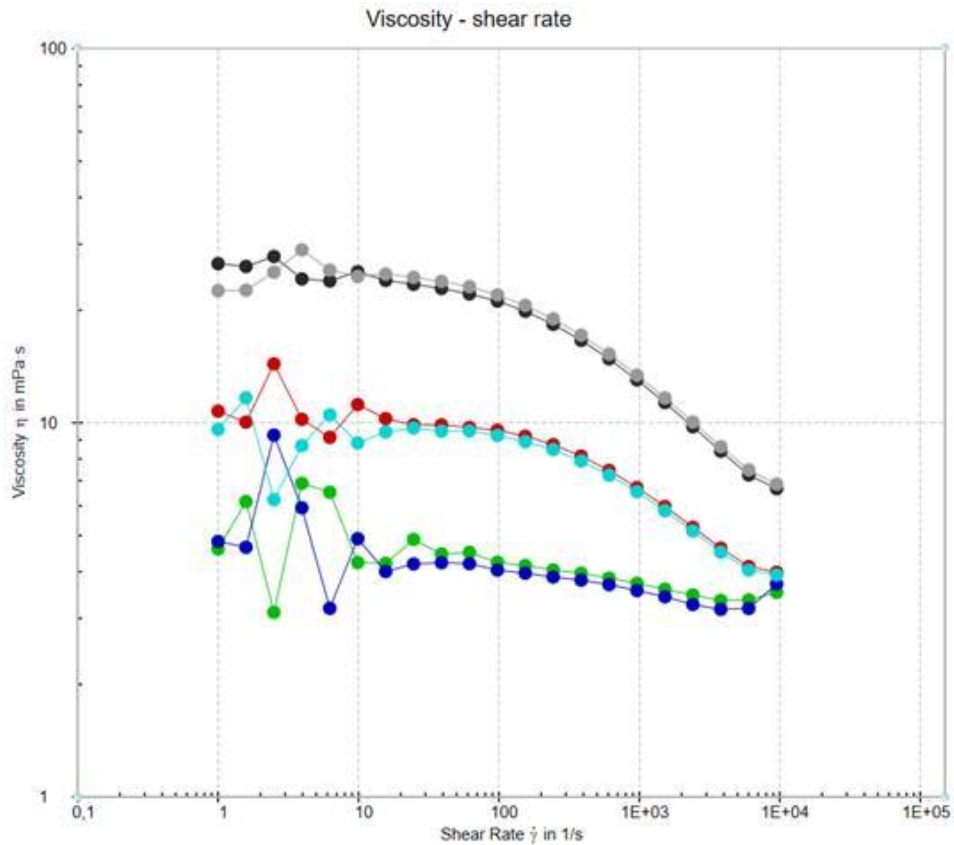
IV (NaHA) (m ³ /kg)	w (NaHA) (%)	w (NaCl) (%)	$\eta(\text{uzorak})$ (mPas) ¹	$\eta(\text{mucin})$ (mPas)	$\eta(\text{mix})$ (mPas)	$\eta(\text{uzorak}) + \eta(\text{mucin})$ (mPas)	$\Delta\eta$ (mPas)	Relativni reološki sinergizam ²
1,7	0,21	0,83	4,92	4,10	11,70	9,20	2,68	1,30
1,7	0,4	0,83	11,26	4,10	24,70	15,36	9,34	1,76
1,7	0,6	0,83	23,38	4,10	54,30	27,48	26,82	1,98
0,6	0,4	0,83	3,87	4,10	7,70	7,97	-0,28	0,97
2,3	0,4	0,83	29,98	4,10	48,06	34,08	13,98	1,41
1,7	0,4	0,208	14,38	4,10	28,73	18,48	10,25	1,55
1,7	0,4	1,66	7,96	4,10	24,87	12,06	12,81	2,06

¹ Ovo je viskoznost uzorka razrijeđenog 50%

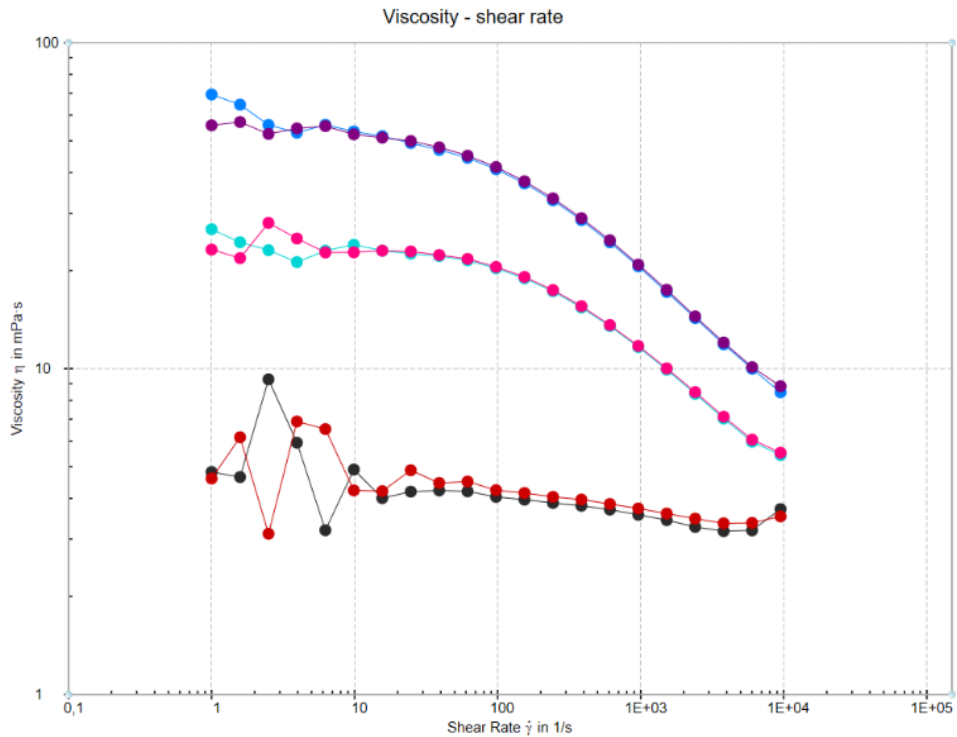
² Izračunat prema formulama 6 i 7. Vrijednosti veće od 1 znače da postoji interakcija s mucinom, a vrijednosti manje od 1 znače da nema interakcije



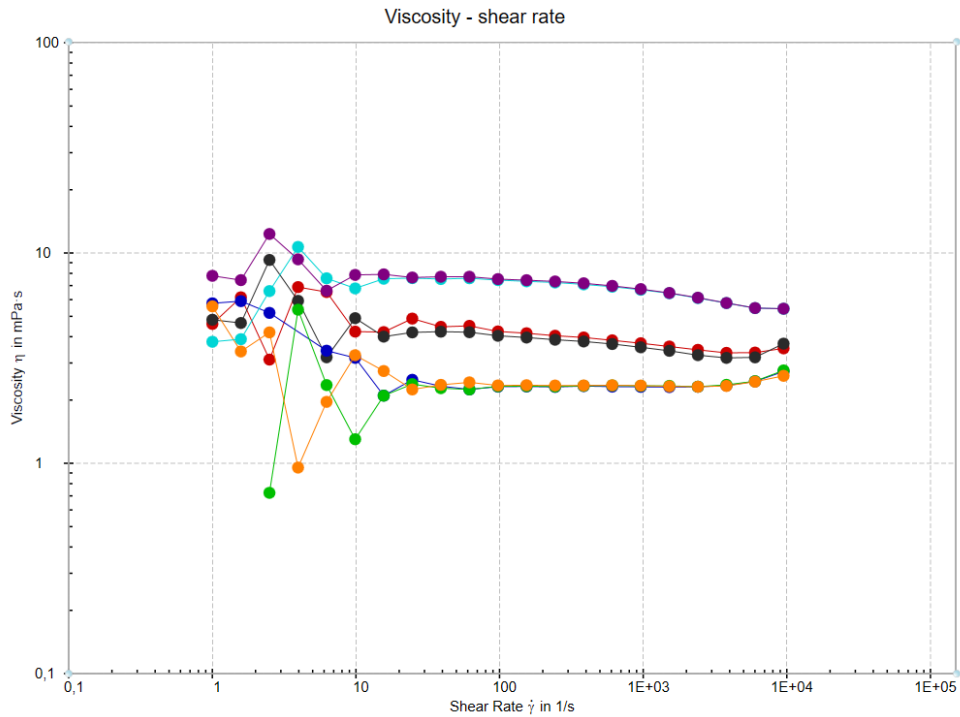
Slika 12.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,21\%$ te masenog udjela natrijeva klorida $0,83\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjerenje; ● otopina mucina - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 1. mjerenje; ● otopina uzorka - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 3. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 3. mjerenje;



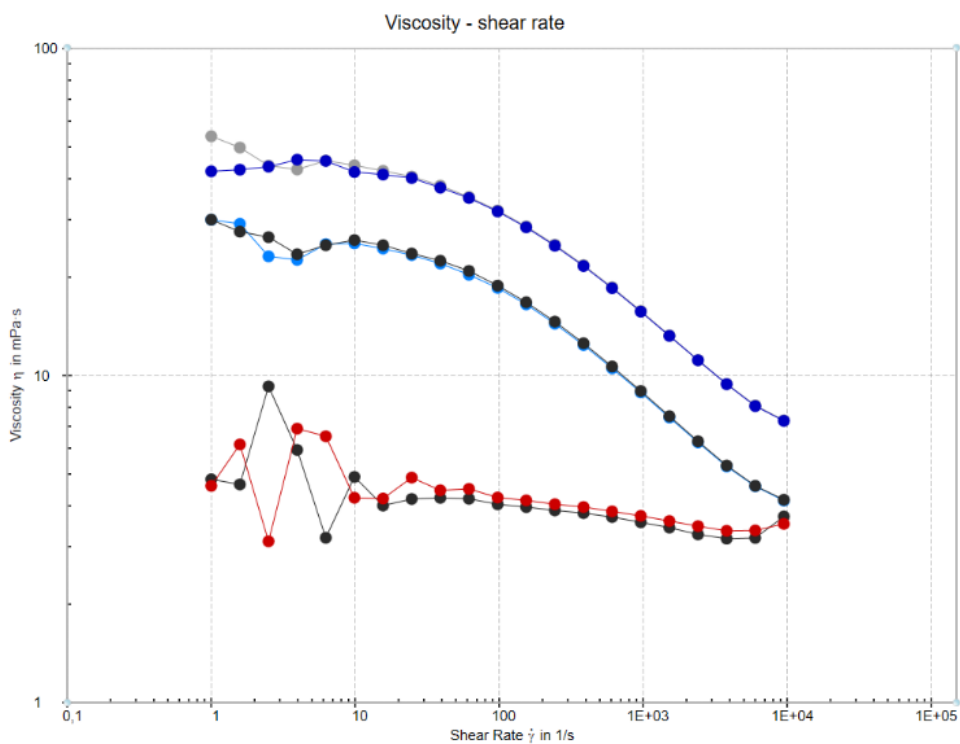
Slika 13.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela 0,4% te masenog udjela natrijeva klorida 0,83%; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjerenje; ● otopina mucina - 2. mjerenje; ● otopina uzorka- 1. mjerenje; ● otopina uzorka- 2. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerenje;



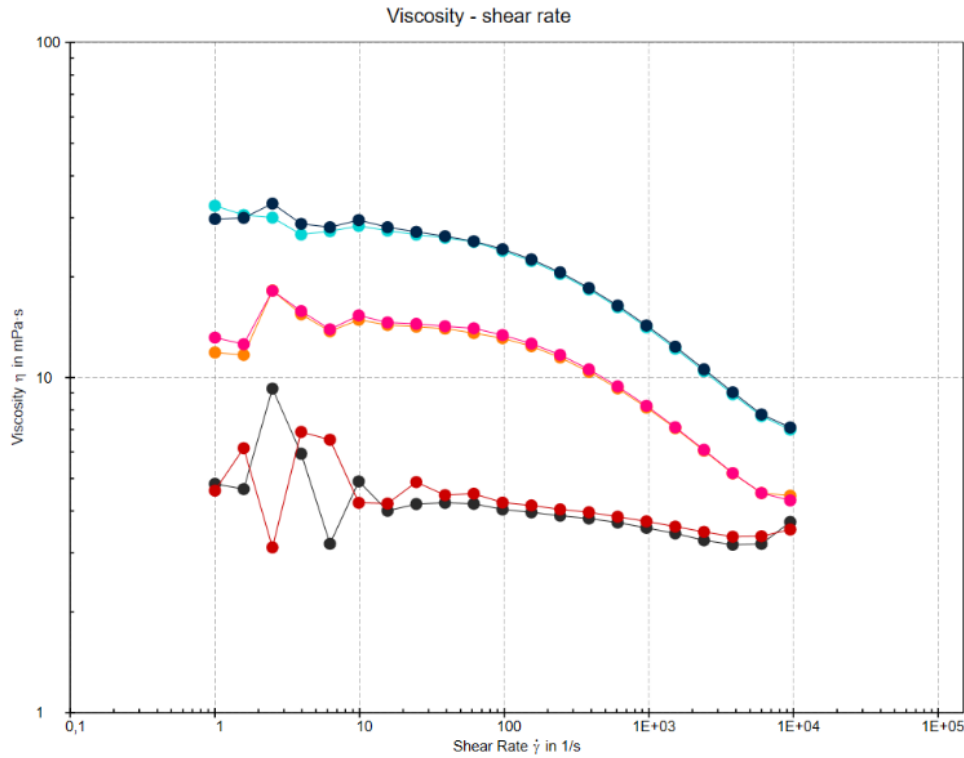
Slika 14.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,6\%$ te maseni udio natrijeva klorida $0,83\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u mPa.s ; ● otopina mucina - 1. mjerenje; ● otopina mucina - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 1. mjerenje; ● otopina uzorka - 2. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerenje;



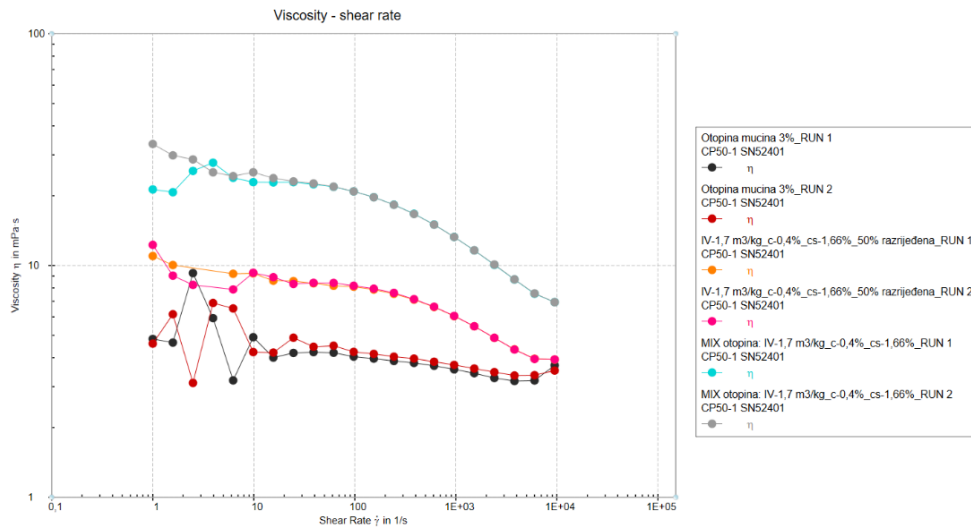
Slika 15.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $0,6 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,4\%$ te masenog udjela natrijeva klorida $0,83\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjerenje; ● otopina mucina - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 1. mjerenje; ● otopina uzorka - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 3. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerenje;



Slika 16.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $2,3 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,4\%$ te masenog udjela natrijeva klorida $0,83\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjerjenje; ● otopina mucina - 2. mjerjenje; ● otopina uzorka - 1. mjerjenje; ● otopina uzorka - 2. mjerjenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerjenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerjenje;



Slika 17.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,4\%$ te masenog udjela natrijeva klorida $0,208\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjenjenje; ● otopina mucina - 2. mjenjenje; ● otopina uzorka - 1. mjenjenje; ● otopina uzorka - 2. mjenjenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjenjenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjenjenje;



Slika 18.: Ovisnost viskoznosti o brzini smicanja za otopine korištene u testu mukoadhezije (otopina mucina, otopina uzorka i otopina smjese mucina i uzorka) za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i masenog udjela $0,4\%$ te masenog udjela natrijeva klorida $1,66\%$; na x osi prikazana je smična brzina (*shear rate*) u $1/\text{s}$, a na y osi je prikazana viskoznost (*viscosity*) u $\text{mPa}\cdot\text{s}$; ● otopina mucina - 1. mjerenje; ● otopina mucina - 2. mjerenje; ● otopina uzorka - 1. mjerenje; ● otopina uzorka - 2. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 1. mjerenje; ● otopina smjese uzorka i mucina - 2. mjerenje;

5. RASPRAVA

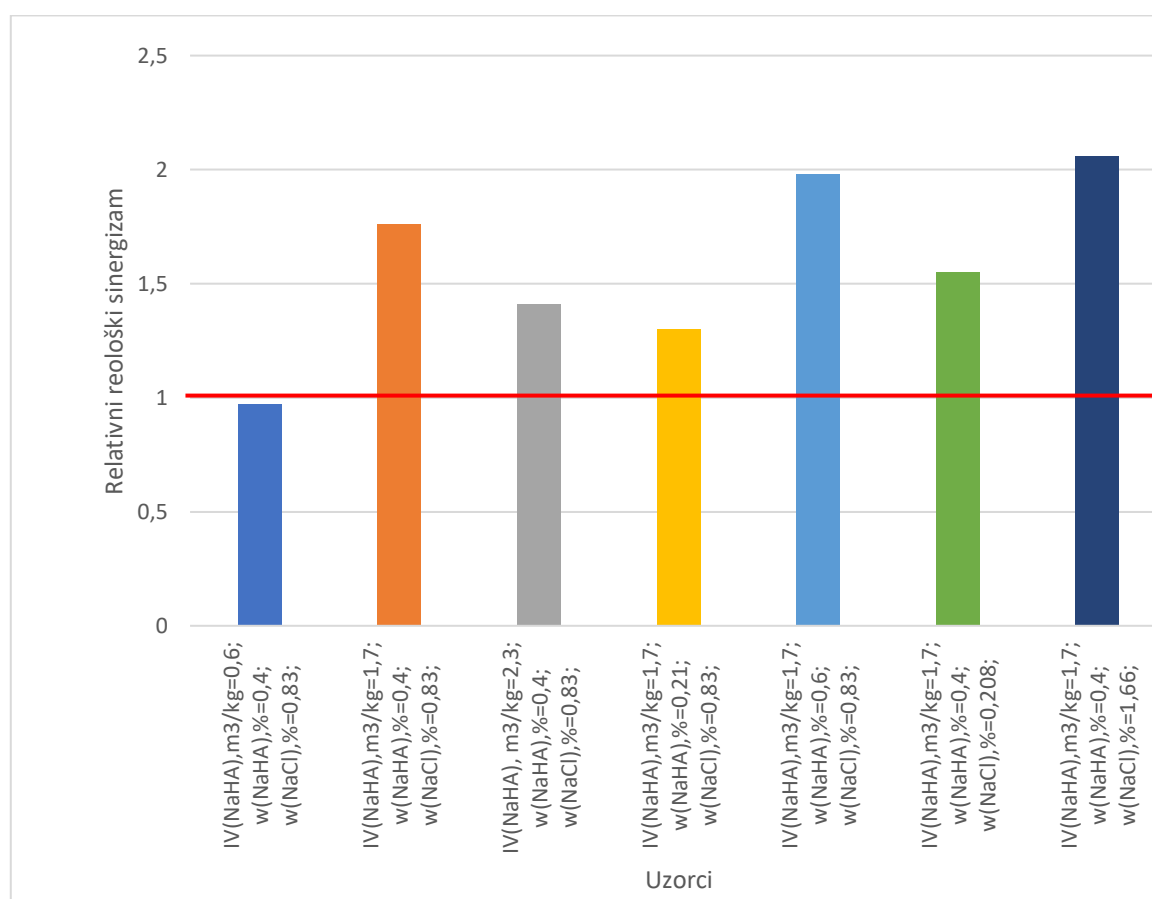
Natrijev hijaluronat čest je sastojak kapi za oko. Osim što vlaži i regenerira oko, natrijev hijaluronat je polimer koji ima mukoadhezivna svojstva, tj. stvara interakciju s mucinom koji je sastavni dio sluznice (mukoze) oka i time produljuje zadržavanje formulacije na oku (29). Dulje zadržavanje na oku omogućuje veću djelotvornost kapi za oko te se danas razvijaju farmaceutske formulacije u tom smjeru. Dobro je poznat utjecaj molekulske mase i koncentracije natrijeva hijaluronata, kao i utjecaj koncentracije soli na viskoznost ovakvih otopina, no nije potvrđen utjecaj tih varijabli na interakciju s mucinom što je glavna svrha ovog rada (24,33).

Otopina natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $0,6 \text{ m}^3/\text{kg}$ (molekulske mase 244 kDa) jedina je pokazala izostanak interakcije s mucinom (vrijednost je manja od 1) (Slika 19, prvi stupac). Kako bi se utvrdilo je li razlog nedostatka interakcije s mucinom mala intrinzična viskoznost odnosno mala molekulska masa natrijeva hijaluronata ili njegova mala koncentracija i posljedično niska viskoznost ispitane otopine, trebala bi se ispitati interakcija s otopinom natrijeva hijaluronata male intrinzične viskoznosti, ali veće koncentracije. Također radi niske viskoznosti i stoga veće varijabilnosti mjerenja potrebno je provesti ispitivanje na većem broju uzoraka.

Kod otopina natrijeva hijaluronata intrinzičnih viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i $2,3 \text{ m}^3/\text{kg}$ postoji interakcija s mucinom, no otopina natrijeva hijaluronata veće intrinzične viskoznosti ($2,3 \text{ m}^3/\text{kg}$) nije pokazala veći reološki sinergizam od otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$. Posljednja je pokazala veći reološki sinergizam od otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $0,6 \text{ m}^3/\text{kg}$. Odnosno nije opažen proporcionalan porast reološkog sinergizma s porastom intrinzične viskoznosti natrijevog hijaluronata (Slika 19, prvi, drugi i treći stupac). Daljnje ispitivanje trebalo bi se nastaviti na način da se ispita više različitih natrijevih hijaluronata (sa širim rasponom intrinzičnih viskoznosti).

Otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$, s različitim masenim udjelima natrijevog hijaluronata 0,21%, 0,4% i 0,6% pokazale su da parametar relativnog reološkog synergizma raste s porastom masenog udjela (Slika 19, četvrti, drugi i peti stupac).

Također, relativni reološki synergizam ispitivan za otopine sa natrijevim hijaluronatom iste intrinzične viskoznosti i masenog udjela raste s porastom osmolalnosti (porastom masenog udjela natrijeva klorida: 0,208%, 0,83% i 1,66%) (Slika 19, stupac šesti, drugi i sedmi stupac).



Slika 19.: Relativni reološki synergizam svih otopina natrijeva hijaluronata različitih intrinzičnih viskoznosti (IV(NaHA), m^3/kg), masenog udjela natrijevog hijaluronatata (w(NaHA), %) i masenog udjela natrijeva klorida (w(NaCl), %)

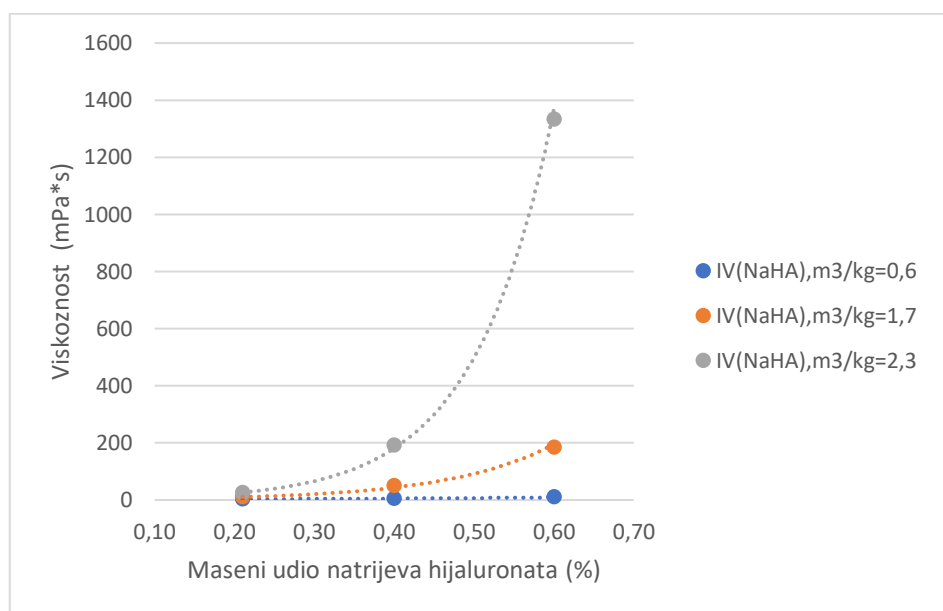
Mjerenjem na reometru dobivene su krivulje ovisnosti viskoznosti o brzini smicanja. Iz dobivenih rezultata (Slike 3. – 11.) vidi se da otopine natrijeva hijaluronata intrinzičnih viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ i $2,3 \text{ m}^3/\text{kg}$ mogu opisati

ponašanjem smičnog stanjivanja koje je karakteristično za ne-Newtonove fluide. Smično stanjivanje je ponašanje u kojem dolazi do smanjenja viskoznosti povećanjem smične brzine (34). Molekule natrijeva hijaluronata velikih molekulskih masa se pri primjeni smične brzine raspjetljavaju i poravnavaju u polju smicanja zbog čega i dolazi do pada u viskoznosti (35). Kod otopina natrijevog hijaluronata manje intrinzične viskoznosti (u ovom slučaju molekulske mase od 244 kDa, intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg) viskoznost ostaje konstantna s povećanjem brzine smicanja što upućuje da otopina s ovom vrstom natrijeva hijaluronata imaju svojstva Newtonovih fluida (Slike 3. – 11.).

Kod otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti 1,7 m³/kg nakon stajanja na uvjetu ubranog starenja na temperaturi od 50 °C, viskoznost pada i ispod viskoznost inicijalno mjerenih za otopine natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti 0,6 m³/kg a koje pokazuju ponašanje Newtonovih fluida. Unatoč niskim viskoznostima nakon 1,5 i 3 mjeseca otopine sa natrijevim hijaluronatima intrinzičnih viskoznosti 1,7 m³/kg i 2,3 m³/kg i dalje pokazuju ne-Newtonovo ponašanje, što govori da reološko ponašanje ne ovisi isključivo o viskoznosti pripremljene otopine, već i o vrsti natrijeva hijaluronata koji je korišten, odnosno njegovoj molekulskoj masi. Ovo može biti objašnjenje za nedostatak interakcije s mucinom kod otopine natrijeva hijaluronata 0,6 m³/kg. U svrhu potvrde potrebna su daljnja ispitivanja s različitim molekulskim masama i koncentracijama natrijeva hijaluronata, kako je prethodno predloženo.

Rezultati utjecaja molekulske mase (intrinzične viskoznosti) i masenog udjela natrijeva hijaluronata na viskoznost otopina dobiveni u ovom radu slažu se s literaturnim podacima (24). Ovim se mjerenjima potvrdilo da viskoznost otopine natrijeva hijaluronata ovisi o njegovoj molekulskoj masi koja raste s porastom intrinzične viskoznosti. Viskoznost raste s porastom intrinzične viskoznosti spoja, tj. s povećanjem molekulske mase spoja. Također, viskoznost otopine eksponencijalno se povećava s povećanjem

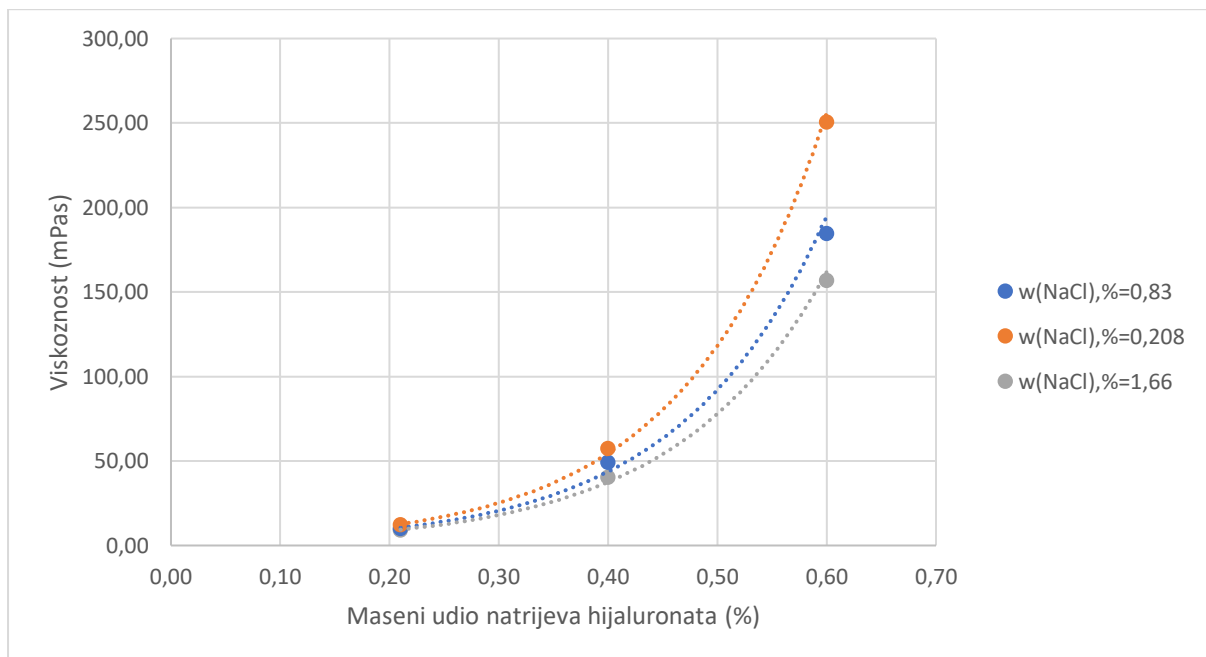
masenog udjela natrijeva hijaluronata (Slika 20.). Razlog tome je što kod otopina natrijeva hijaluronata veće molekulske mase i koncentracije dolazi do lakše zapetljanja, čime se stvara složenija i otpornija trodimenzionalna mreža polimera što rezultira povećanjem viskoznosti i viskoelastičnosti spoja. S druge strane, kraći lanci se ne zapliću tako učinkovito što ne pridonosi značajnom povećanju viskoznosti te rezultira manjom viskoznosti (36).



Slika 20.: Odnos viskoznosti i masenog udjela natrijeva hijaluronata tri natrijeva hijaluronata različitih intrinzičnih viskoznosti (IV(NaHA)); maseni udio natrijeva klorida je 0,83%; mjerenje je provedeno neposredno nakon izrade (T0)

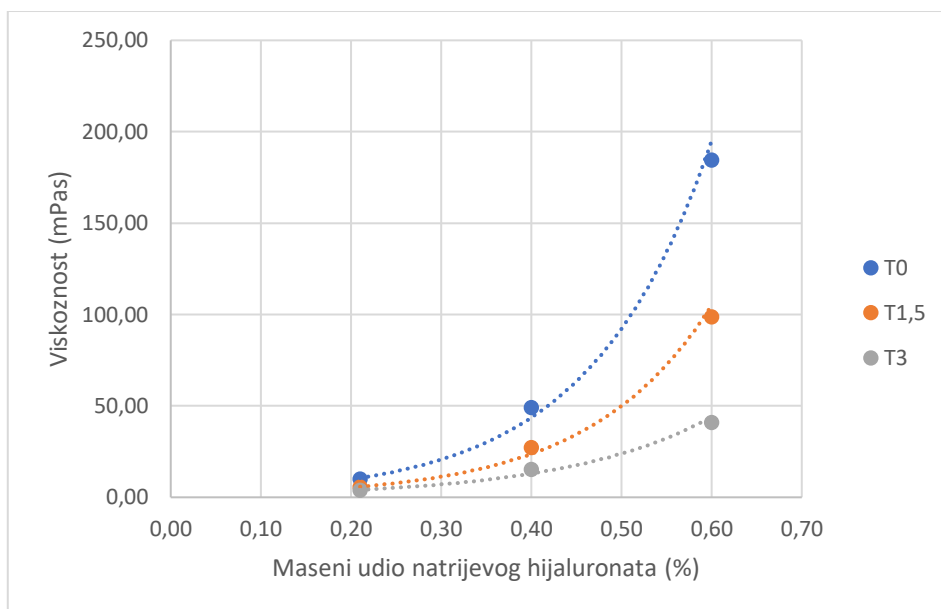
Otopine s 0,208 % i 1,66% natrijeva klorida imaju isto ponašanje s obzirom na koncentraciju i vrstu natrijeva hijaluronata kao što i imaju otopine s 0,83% natrijeva klorida. Točnije, s porastom intrinzične viskoznosti natrijeva hijaluronata, raste i viskoznost, kao i s porastom njegova masenog udjela. Otopine s 0,208% natrijevog klorida imaju najveću viskoznost te ona pada s povećanjem masenog udjela natrijeva klorida (Slika 21.). Natrijev hijaluronat ima negativno nabijene karboksilne skupine duž cijelog lanca. Povećanjem koncentracije natrijeva klorida, povećava se koncentracije natrijevih iona koji smanjuju elektrostatsko odbijanje između karboksilnih skupina u polimernom lancu što dovodi do smanjena dimenzije

molekula natrijeva hijaluronata te posljedično do smanjenja viskoznosti otopine (33).



Slika 21.: Odnos viskoznosti i masenog udjela natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$ u otopinama s tri masena udjela natrijeva klorida; mjerenje je provedeno neposredno nakon izrade (T0)

Stajanjem na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon 1,5 mjeseci primijećen je pad u viskoznosti kod svih otopina, te nakon 3 mjeseca viskoznost je dodatno pala. Kod otopina s natrijevim hijaluronatom intrinzične viskoznosti $0,6 \text{ m}^3/\text{kg}$ vidljiv je manji pad u viskoznosti nakon stajanja na uvjetu, ali su i same viskoznosti niske u odnosu na vrijednosti viskoznosti kod natrijeva hijaluronata većih intrinzičnih viskoznosti. Do smanjenja viskoznosti je došlo zato što se polimeri poput natrijeva hijaluronata mogu razgraditi izlaganjem visokim temperaturama. Razgradnja može rezultirati smanjenjem molekulske mase, raskidanjem lanaca i promjenom konformacije polimera (37). Također, viskoznost je bila niža nakon dužeg stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ jer se razgradnja natrijeva hijaluronata povećava i s vremenom zagrijavanja, tj. stajanja na visokim temperaturama (Slika 22.) (38).



Slika 22.: Odnos viskoznosti i masenog udjela natrijeva hijaluronata intrinzične viskoznosti $1,7 \text{ m}^3/\text{kg}$; neposredno nakon izrade (T0), nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1,5 mjeseci (T1,5) i nakon stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 3 mjeseca (T3); maseni udio natrijeva klorida je 0,83%

Kako bi otopina natrijeva hijaluronata bila odobrena za korištenje kao kapi za oči potrebno je zadovoljiti određene farmaceutske zahtjeve. pH otopina bio je u rasponu 6,8 - 7,1 što je optimalno za otopine koje bi se koristile kao kapi za oči kako bi bile ugodne za oko (39,40). Ispitivane otopine pripravljene su s ciljanim pH, a ovim radom je potvrđeno da ne dolazi do promjena na povišenim temperaturama i starenjem otopine.

Osmolalnost otopina također je bitno svojstvo kapi za oči. Hipotonične i izotonične otopine natrijeva hijaluronata mogle bi se koristiti za smanjenje neugodnog osjećaja u oku, oštećenja površine oka i upale koji se javljaju kao posljedica hiperosmolalnosti koja je simptom sindroma suhog oka (41), dok hipertonične otopine mogu izazivati nelagodu.

Idealne kapi za oči oponašat će površinsku napetost koja se nalazi u oku. Odgovarajuća površinska napetost omogućuje kapima za oči da rade svoj posao, tj. navlažuju površinu oka. Stabilni suzni film ima površinsku napetost od 40 do 46 nM/m, dok je kod suhih očiju površinska napetost suznog filma između 44 i 53 nM/m (42). S nižom površinskom napetosti

pospješuju se svojstva vlaženja, ali ako je površinska napetost preniska može doći do stvaranja nehomogenog filma na oku. Zato se smatra da je najbolje da kapi za oči imaju sličnu površinsku napetost kao suzni film osoba koje nemaju suhe oči (42). Sve otopine pripremljene s BAK-om imaju sličnu površinsku napetost kao i suzni film.

Benzalkonijev klorid (BAK) je amonijev spoj koji ima različite primjene, uključujući upotrebu kao konzervans u otopinama kako bi se zaštitile od mikroorganizama. Također, to je kationski surfaktant (44). Kada se doda otopini natrijeva hijaluronata, BAK može imati nekoliko učinaka na svojstva otopine. Jedno je od svojstva na koja djeluje kao kationski surfaktant je površinska napetost. Otopine s BAK-om imaju manju površinsku napetost u usporedbi s otopinom bez BAK-a. To se događa jer molekule BAK-a imaju tendenciju nakupljanja na granici tekućina-zrak. Na taj način smanjuju privlačne sile između molekula vode na površini što onda vodi do smanjenja površinske napetosti (45). Osim površinske napetosti, drugi se parametri ne razlikuju značajno u odnosu na otopine s BAK-om.

Kako bi se ispitalo utječu li mikroorganizmi na svojstva otopina proveda se sterilna filtracija na otopini natrijeva hijaluronata bez BAK-a. Pomoću sterilne filtracije mikroorganizmi se uklanjaju iz farmaceutskih proizvoda (47). Otopina je, također pokazala razlike u površinskoj napetosti, no na to je utjecao izostanak BAK-a u sterilno filtriranoj otopini. U T1,5 intervalu vidljiva je velika razlika u viskoznosti, dok su, nakon 3 mjeseca stajanja na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi 50 °C, viskoznosti približno jednake. Velika razlika nakon 1,5 mjeseci se dogodila zato što otopina koja je sterilno filtrirana nije mogla biti izmjerena odmah nakon što je izvađena sa uvjeta zbog tehničkih problema. Uzorak je mjeran nakon što je prošlo dodatnih mjesec dana od vađenja s uvjeta ubrzanog starenja na temperaturi 50 °C te se pretpostavlja da je unatoč vađenju s uvjeta povišene temperature došlo do razgradnje natrijeva hijaluronata starenjem. Tome ide u prilog i činjenica da se vrijednosti nakon 3 mjeseca značajno ne razlikuju. Zaključno rezultati za sterilnu otopinu i nesterilnu

otopinu pripremljenu s konzervansom (BAK) se ne razlikuju osim površinske napetosti na koje utječe BAK kao surfaktant. Time je potvrđeno da je BAK djelotvoran u zaštiti od mikroorganizama te mikroorganizmi nisu promijenili svojstva otopina na koje utječe natrijev hijaluronat.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada dokazuju da mukoadhezijska svojstva natrijeva hijaluronata ovise o njegovoj molekulskoj masi i koncentraciji u otopini te osmolalnost same otopine. S povećanjem masenog udjela natrijeva hijaluronata kao i s povećanjem osmolalnosti otopine, povećava se interakcija s mucinom (izražena kao relativni reološki sinergizam). U ispitivanim formulacijama kod otopine natrijeva hijaluronata niske molekulske mase (<250kDa) nije opažena interakcija s mucinom. Otopine s natrijevim hijaluronatima veće molekulske mase: 980 kDa i 1420 kDa stvaraju interakciju, no temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da s porastom molekulske mase ne dolazi do proporcionalnog rasta interakcije.

Ovim se radom potvrdilo da se u ispitivanim formulacijama viskoznost otopina povećava s povećanjem intrinzične viskoznosti i koncentracije natrijeva hijaluronata, a smanjuje se s povećanjem osmolalnosti kao i sa stajanjem na uvjetu ubrzanog starenja na temperaturi od 50 °C.

Također, rezultati potvrđuju da reološko ponašanje otopina s natrijevim hijaluronatom ovisi o njegovoj molekulskoj masi, odnosno duljini lanaca. Natrijevi hijaluronati veće molekulske mase, u ovom slučaju 980 kDa i 1420 kDa, su pokazali ne-Newtonovo ponašanje, dok je natrijev hijaluronat manje molekulske mase, 244 kDa, pokazao Newtonovo ponašanje. Otopine natrijeva hijaluronata većih molekulskih masa zadržale su ne-Newtonovo ponašanje čak i kad im je viskoznost uslijed djelovanja povišene temperature i starenja pala na niske vrijednosti slične onima koje su imale otopine sa hijaluronatom male molekulske mase, čime je potvrđeno da reološko ponašanje ne ovisi o viskoznosti pripremljenih otopina već u prvom redu o molekulskoj masi odnosno duljini lanaca korištenih natrijevih hijaluronata.

Rezultati ovog rada mogu biti doprinos kod razvoja formulacija kapi za oči. U daljnjim istraživanjima trebalo bi se detaljnije ispitivati mukoadhezivna svojstva u ovisnosti o molekulskoj masi. Također, s obzirom da je došlo do promjene u reološkim karakteristikama otopina nakon stajanja na uvjetu

ubrzanog starenja na temperaturi 50 °C, trebalo bi se ispitati utječu li vrijeme stajanja i temperatura na promjenu mukoadhezivnog svojstva. Zbog velike varijabilnost rezultata, dobivenih reološkom metodom Hagestrom (2003.) je predložila da se ova reološka metoda ne bi trebala koristiti kao samostalna metoda za procjenu intenziteta mukoadhezije polimernih otopina. Uz ovu metodu, za određivanje mukoadhezijskih svojstva mogle bi se koristiti još metode poput mjerenja zeta potencijala (49). Dok se rezultati dobiveni u ovom radu mogu smatrati dobrom osnovom za daljnja istraživanja.

7. LITERATURA

1. European Pharmacopoeia. 11th edition. Strasbourg (FR): Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2023.
2. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito D V., Klaassen CD, Marks JG, Shank RC, et al. Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate. 2016; 28(4_suppl):5-67.
3. Prabhasawat P, Tesavibul N, Kasetzuwan N. Performance profile of sodium hyaluronate in patients with lipid tear deficiency: Randomised, double-blind, controlled, exploratory study. *British Journal of Ophthalmology*. 2007; 91(1):47-50.
4. Higashide T, Sugiyama K. Use of viscoelastic substance in ophthalmic surgery – focus on sodium hyaluronate. *Clin Ophthalmol*. 2008; 2(1):21.
5. Ruckmani K, Shaikh SZ, Khalil P, Muneera MS, Thusleem OA. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC-UV. *J Pharm Anal*. 2013;3(5):324-9.
6. Lu W, Mays J. Dilute solution viscometry of polymers. In: *Molecular Characterization of Polymers*. Elsevier; 2021. p. 261-80.
7. Saegusa H, Chiba S, Kitagawa H. United States Patent to (54) Method for producing sodium hyaluronate by fermentation method, Masamichi Hashimoto, Tokyo, 1990.
8. Guillaumie F, Malle BM, Schwach-Abdellaoui K, Beck TC. A New Sodium Hyaluronate for Skin Moisturization and Antiaging. 2006
9. Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. Vol. 10, *Microbial Cell Factories*. 2011.

10. Peck J, Slovek A, Miro P, Vij N, Traube B, Lee C, et al. c. Orthop Rev (Pavia). 2021;13(2):25549.
11. Balazs EA, Biotrics Inc. Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. 1977;
12. Higashide T, Sugiyama K. Use of viscoelastic substance in ophthalmic surgery - focus on sodium hyaluronate. Clin Ophthalmol. 2008; 2(1):21–30.
13. Hirose R, Yoshida T, Naito Y, Watanabe N, Hashimoto H, Sugino S, et al. Differences between two sodium hyaluronate-based submucosal injection materials currently used in Japan based on viscosity analysis. Sci Rep. 2021; 11(1):5693.
14. Cheema A, Aziz T, Mirza SA, Siddiqi A, Masheshwary N, Khan MA. Sodium hyaluronate eye drops in the treatment of dry eye disease: an open label, uncontrolled, multi-centre trial. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2012.
15. Ang BCH, Sng JJ, Wang PXH, Htoon HM, Tong LHT. Sodium Hyaluronate in the Treatment of Dry Eye Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 7, Scientific Reports. Nature Publishing Group; 2017.
16. Eliades T, Zinelis S, Kim DG, Brantley W. Structure/property relationships in orthodontic polymers. Orthodontic Applications of Biomaterials: A Clinical Guide. 2017; 39–59.
17. Wilson DI. What is rheology?. Eye (Basingstoke). 2018; 32(2):179–83.
18. Arshinoff SA, Hofmann I, Nae H. Role of rheology in tears and artificial tears. Vol. 47, Journal of Cataract and Refractive Surgery. Lippincott Williams and Wilkins; 2021. p. 655–61.

19. Kazemian S, Prasad A, Huat BBK. Rheological Behavior of Grout in Context of Newtonian and non-Newtonian Fluids Alkaline activation for soil improvement, 2010.
20. Papanicolaou GC, Zaoutsos SP. Viscoelastic constitutive modeling of creep and stress relaxation in polymers and polymer matrix composites. In: Creep and Fatigue in Polymer Matrix Composites. Elsevier Ltd.; 2010. p. 3–47.
21. Drapaca CS, Sivaloganathan S, Tenti G. Nonlinear constitutive laws in viscoelasticity. Vol. 12, Mathematics and Mechanics of Solids. 2007. p. 475–501.
22. Wang Q, Shi A, Shah F. Rheology instruments for food quality evaluation. Evaluation Technologies for Food Quality. 2019; 465–90.
23. Bair S. Measurement Techniques for the Shear Dependence of Viscosity at Elevated Pressure. High Pressure Rheology for Quantitative Elastohydrodynamics. 2019; 183–221.
24. Müller-Lierheim WGK. Why Chain Length of Hyaluronan in Eye Drops Matters. Diagnostics (Basel). 2020; 10(8).
25. Jaganath N. The Application of Rheological Techniques in the Characterization of Semisolids in the Pharmaceutical Industry. 2004.
26. Rossi S, Bonferoni MC, Lippoli G, Bertoni M, Fermi F, Caramella C, et al. Influence of mucin type mucin rheological interactions * on polymer. Vol. 16, Bio m o t e r i a l s. 1995.
27. Simões A, Miranda M, Cardoso C, Veiga F, Vitorino C. Rheology by design: A regulatory tutorial for analytical method validation. Pharmaceutics. 2020; 12(9):1–27.
28. EMA. Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products. 2018.

29. Rossi S, Vigani B, Bonferoni MC, Sandri G, Caramella C, Ferrari F. Rheological analysis and mucoadhesion: A 30 year-old and still active combination. Vol. 156, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2018. p. 232–8.
30. Haas J, Lehr CM. Developments in the area of bioadhesive drug delivery systems. *Expert Opin Biol Ther*. 2002 Mar;2(3):287–98.
31. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011; 3(1):89–100.
32. Tang Z, Yin L, Zhang Y, Yu W, Wang Q, Zhan Z. Preparation and study of two kinds of ophthalmic nano-preparations of everolimus. *Drug Deliv*. 2019; 26(1):1235–42.
33. Mo Y, Takaya T, Nishinari K, Kubota K, Okamoto A. Effects of sodium chloride, guanidine hydrochloride, and sucrose on the viscoelastic properties of sodium hyaluronate solutions. *Biopolymers*. 1999;50(1):23–34.
34. George H.F., Qureshi F. Newtonian and Non-Newtonian Fluids, Newton's Law of Viscosity. *Encyclopedia of Tribiology*. 2013.
35. Rebenda D, Vrbka M, Čípek P, Toropitsyn E, Nečas D, Pravda M, et al. On the dependence of rheology of hyaluronic acid solutions and frictional behavior of articular cartilage. *Materials*. 2020; 13(11).
36. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. Vol. 12, *Polymers*. MDPI AG; 2020.
37. Lowry KM, Beavers EM. Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution.

38. Mondek J, Kalina M, Simulescu V, Pekař M. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polym Degrad Stab.* 2015; 120:107–13.
39. Carney LG. Human Tear pH. *Archives of Ophthalmology.* 1976; 94(5):821.
40. López-Alemaný A, Garcia-Valldecabres M. Ocular physiology and artificial tears. Article in *Journal of the American Optometric Association.* 1999.
41. Aragona P, Di Stefano G, Ferreri F, Spinella R, Stilo A. Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjögren's syndrome patients. *British Journal of Ophthalmology.* 2002;86(8):879–84.
42. Hotujac Grgurević M, Juretić M, Hafner A, Lovrić J, Pepić I. Tear fluid-eye drops compatibility assessment using surface tension. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017; 43(2):275–82.
43. Gupta V, Trivedi P. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical topical nanocarriers containing anticancer drugs for skin cancer treatment. In: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting.* Elsevier; 2018. p. 563–627.
44. Watrobska-Swietlikowska D. Distribution of benzalkonium chloride into the aqueous phases of submicron dispersed systems: emulsions, aqueous lecithin dispersion and nanospheres. *AAPS PharmSciTech.* 2019; 21(1):7.
45. Fernandes AR, Sanchez-Lopez E, Santos T Dos, Garcia ML, Silva AM, Souto EB. Development and Characterization of Nanoemulsions for Ophthalmic Applications: Role of Cationic Surfactants. *Materials (Basel).* 2021; 14(24).
46. Watrobska–Swietlikowska D. Distribution of benzalkonium chloride into the aqueous phases of submicron dispersed systems: emulsions,

- aqueous lecithin dispersion and nanospheres. *AAPS PharmSciTech*. 2020; 21(1).
47. Jornitz MW, Soelkner PG, Meltzer TH. The economics of modern sterile filtration Creation of manufacturing facility platform catalogue View project Single-use manufacturing systems for the biopharmaceutical industries View project Maik W Jornitz Bioprocess Resources LLC Sterile Filtration-A Review of the Past and Present Technologies. 2003
 48. Hägerström H, Edsman K. Limitations of the rheological mucoadhesion method: the effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18(5):349–57.
 49. Graça A, Gonçalves LM, Raposo S, Ribeiro HM, Marto J. Useful in vitro techniques to evaluate the mucoadhesive properties of hyaluronic acid-based ocular delivery systems. *Pharmaceutics*. 2018; 10(3).

8. ŽIVOTOPIS

Klara Strbad

- **Kućna :** M. P. Miškine 2, 40328, Donja Dubrava, Hrvatska
- **E-adresa:** kstrbad72@gmail.com
- **Telefonski broj:** (+385) 993074991
- **Datum rođenja:** 17/12/1999
- **Državljanstvo:** hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

[01/07/2023 – Trenutačno]

- **Rad u laboratoriju**

Jadran-galenski laboratorij d.d.

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Rad u laboratoriju u odjelu Istraživanja i razvoja

[11/2022 – 07/2023]

- **Izrada diplomskog rada**

Jadran-galenski laboratorij d.d.

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Tema: Mukoadhezija farmaceutskih otopina koje sadrže natrijev hijaluronat - utjecaj koncentracije i molekulske mase natrijevog hijaluronata

Mentor: dr.sc. Jasminka Giacometti

Komentor: dr.sc. Dijana Jureša

Ekperimentalni dio izrađen u odjelu Istraživanja i razvoja, JGL d.d.

[15/05/2023 – 31/05/2023]

- **Demonstrature**

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Demonstrature iz kolegija Analitička kemija

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

[10/2021 – 09/2023]

- **Magistra istraživanja i razvoja lijekova**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u

Rijeci <https://www.biotech.uniri.hr/hr/studiji/diplomski-sveucilisni-studij-istrazivanje-i-razvoj-lijekova.html>

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

[10/2018 – 07/2021]

- **Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova**

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci <https://www.biotech.uniri.hr/hr/>

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000, Rijeka, Hrvatska

Konačna ocjena: cum laude

[09/2014 – 06/2018]

- **Srednja škola**

Gimnazija "Fran Galović" Koprivnica <http://www.gimnazija-fgalovic-koprivnica.skole.hr/>

Adresa: Ulica DR. Ž. Selinger 3a, 48000 Koprivnica , 48000 , Koprivnica , Hrvatska

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C2 ČITANJE C2 PISANJE C2

GOVORNA PRODUKCIJA C2 GOVORNA INTERAKCIJA C2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Komunikacijski programi (Skype, Zoom, TeamViewer) MS Office (MS Word, MS PowerPoint, MS Excel, MS Outlook, MS Teams)

VOZAČKA DOZVOLA

Automobili: B

VOLONTIRANJE

- [Trenutačno]

Volontiranje u Udruzi studenata biotehnologije Rijeka