

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

**FORMULACE A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ
PRO LOKÁLNÍ LÉČBU MUSKULOSKELETÁLNÍCH
INFEKČÍ**

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Šnejdřová Eva, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Pavčina Drdová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování diplomové práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 21. 4. 2022

Pavína Drdová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala především PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za vedení diplomové práce, cenné rady, trpělivost a čas věnovaný konzultacím. Poděkování patří také Doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. a MUDr. Liboru Prokešovi z ortopedické kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, PharmDr. Janě Malákové, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové, Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Hrade Králové a MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Obsah

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT.....	7
3. ÚVOD.....	8
4. ZKRATKY	9
5. CÍL PRÁCE	10
6. TEORETICKÁ ČÁST	11
6.1. Muskuloskeletální infekce	11
6.2. Léčba muskuloskeletálních infekcí	12
6.2.1. Nedegradabilní systémy.....	13
6.2.2. Biodegradabilní terapeutické systémy	14
6.3. Gely jako depotní terapeutické systémy	18
6.3.1. <i>In situ</i> hydrogely	21
6.3.1. Uvolňování léčiv z polymerních gelů.....	24
6.3.2. Hydrogely s antimikrobiálním účinkem	26
6.4. Reologické chování gelů	28
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
7.1. Použité suroviny.....	33
7.2. Použité přístroje	33
7.3. Přehled vzorků	34
7.4. Postup přípravy vzorků	35
7.4.1. Příprava gelů hypromelosity	35
7.4.2. Příprava gelů iota karagenanu.....	35
7.4.3. Příprava gelů želatiny	36
7.5. Měření tokových vlastností	36
7.6. Měření viskoelastických vlastností	37

7.7.	Hodnocení proliferace a viability buněk <i>in vitro</i>	38
7.8.	Disoluční testy gentamicinu a vankomycinu	38
8.	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
8.1.	Tokové vlastnosti disperzí polymerů	41
8.2.	Viskoelastické vlastnosti	48
8.3.	Prolifrace a viabilita mezenchymálních kmenových buněk	54
8.4.	Disoluce antibiotik	55
8.4.1.	Disoluce gentamicinu	57
8.4.2.	Disoluce vankomycinu	58
9.	ZÁVĚRY	60
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Pavlína Drdová
Název práce: Formulace a charakterizace hydrogelů pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí
Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Lokální protiinfekční terapie muskuloskeletálních infekcí eliminuje systémovou toxicitu léčiv. Výběrem vhodného terapeutického systému lze dosáhnout vyšších koncentrací léčiva v místě infekce a prodlouženého uvolňování. Takovým systémem mohou být gely, formulované a testované v předložené diplomové práci. Teoretická část práce byla věnována popisu muskuloskeletálních infekcí a jejich léčbě, charakterizaci gelů a jejich využití při parenterální aplikaci. Byly formulovány hydrofilní gely na bázi hypromelosy, želatiny, rybí želatiny a iota-karagenanu obsahující vankomycin-hydrochlorid a gentamicin-sulfát. Byly testovány tokové a viskoelastické vlastnosti na rotačním reometru. Analýzou tokových křivek mocninným modelem se prokázal nenewtonský typ toku. Nejcitlivější na aplikované namáhání je hypromelosový gel 3 %, nejméně disperze iota-karagenanu s povidonem 25. Viskoelastické vlastnosti byly hodnoceny pomocí elastického, viskózního a komplexního modulu, fázového úhlu a meze toku. Z testovaných formulací pouze 3 % disperze hypromelosy a 10 % disperze rybí želatiny mají vnitřní 3D strukturu odpovídající gelům. Pro *ex vivo* testování toxicity a disoluce byl vybrán 3 % hypromelosový gel s antibiotiky. Viabilita a proliferace mesenchymálních buněk nebyla významně ovlivněna. V disolučních testech *ex vivo* po impregnaci kostních štěpů gelem došlo v porovnání s roztokem antibiotik ke snížení burst efektu a k prodloužení uvolňování gentamicin-sulfátu na 3 dny, v případě vankomycin-hydrochloridu na 5 dní.

Klíčová slova: muskuloskeletální infekce; antibiotika; hydrogely; tokové vlastnosti; viskoelastické vlastnosti; uvolňování léčiv

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Pavlína Drdová

Title of thesis: Formulation and characterization of hydrogels for local treatment of musculoskeletal infection

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Local anti-infective therapy for musculoskeletal infections eliminates systemic drug toxicity. By selecting a suitable drug delivery system, higher drug concentrations at the site of infection and sustained release can be achieved. Such a system may be gels, formulated and tested in the submitted diploma thesis. The theoretical part of the work was devoted to the description of musculoskeletal infections and their treatment, characterization of gels and their use in parenteral administration. Hydrophilic gels based on hypromellose, carrageenan, gelatin and fish gelatin containing vancomycin hydrochloride and gentamicin sulfate were formulated. Flow and viscoelastic properties were tested on a rotational rheometer. The analysis of flow curves by the Power law model proved a non-Newtonian type of flow. The most sensitive to applied stress is a 3 % hypromellose gel, the least a dispersion of iota-carrageenan with povidone 25. Viscoelastic properties were evaluated based on elastic, viscous and complex modulus, phase angle and yield point. Of the formulations tested, only 3 % hypromellose dispersion and 10 % fish gelatin dispersion have an inner 3D structure corresponding to gels. A 3 % hypromellose gel with antibiotics was selected for *ex vivo* toxicity and dissolution testing. Mesenchymal cell viability and proliferation were not significantly affected. In *ex vivo* dissolution tests after gel impregnation of bone grafts, the burst effect was reduced compared to the antibiotic solution and the release was prolonged in the case of gentamicin sulphate to 3 days, in the case of vancomycin hydrochloride to 5 days.

Keywords: musculoskeletal infections; antibiotics; hydrogels; flow properties; viscoelastic properties; drug release

3. ÚVOD

Muskuloskeletálními infekcemi se rozumí soubor infekčních onemocnění, které napadají pohybový aparát pacienta. Lze mezi ně zařadit myositidu, osteomyelitidu, tendinitidu či septickou artritidu. Z velké části tyto infekce způsobuje poranění, jako je například otevřená zlomenina. Mohou být způsobené i jako následek dekubitů, nebo se patogen na místo působení dostane krevní cestou. Původcem onemocnění jsou především bakterie. Terapie těchto onemocnění se zahajuje parenterálním podáváním antiinfektiv, po kterém následuje jejich podávání perorálně. Systémová terapie je pro organismus pacienta toxická. Alternativu proto představuje podávání antiinfektiv lokálně pomocí vhodných terapeutických systémů. Dostupné jsou terapeutické systémy nedegradabilní (kostní cement), i degradabilní (kolagenní houba, kostní štěpy aj.). Hlavním požadavkem na tyto lékové formy je jejich schopnost uvolňovat antibiotikum po co nejdelší dobu a v dostatečně vysoké koncentraci, aby došlo ke kompletní eradikaci patogenu nebo efektivní prevenci.

Práce vznikla na základě spolupráce s ortopedickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové. Na tomto pracovišti byla testována kinetika uvolňování antibiotik z kostních štěpů impregnovaných roztokem gentamicinu a vankomycinu.

Cílem této práce bylo v návaznosti na studii Doc. MUDr. Tomáše Kučery, Ph.D.⁶⁶ připravit terapeutickou formulaci, která umožní prodloužené uvolňování antibiotik a zajistí jeho dostatečné koncentrace potřebné k eradikaci patogenu. V úvahu připadá několik depotních lékových forem, a to gely, emulze typu v/o nebo degradovatelné pevné polymerní systémy jako jsou tuhé disperze, tenké filmy nebo částicové formulace.

4. ZKRATKY

HEMA	hydroxyethylmethakrylát
HPMC	hydroxypropylmethylcelulosa, hypromelosa
LCST	nízká kritická teplota roztoku
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PAM	polyakrylamid
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	polyester kyseliny mléčné a glykolové
PMMA	polymethylmethakrylát
PNIPAM	poly(N-isopropylakrylamid)
PPO	polypropylenoxid
PVA	polyvinylacetát
PVP	polyvinylpyrrolidon, povidon
UCST	horní kritická teplota roztoku

5. CÍL PRÁCE

Zadáním diplomové práce byla formulace hydrofilních gelů s antibiotiky a hodnocení jejich tokového chování a viskoelastických vlastností. Dále se diplomová práce zabývá studiem disoluce gentamicinu a vankomycinu z kostních štěpů impregnovaných hydrofilním gelem.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Vyhledání a studium odborné literatury zabývající se problematikou muskuloskeletálních infekcí a jejich lokální léčby.
2. Formulace hydrofilních gelů na bázi hydroxypropylmethylcelulosity, iota-karagenanu, želatiny a rybí želatiny s gentamicinem a vankomycinem.
3. Charakterizace tokového chování gelů a popis pomocí vhodných reologických modelů. Studium vlivu složení gelů na tokové vlastnosti.
4. Charakterizace viskoelastického chování gelů pomocí oscilačních testů. Studium vlivu složení gelu na viskoelastické vlastnosti.
5. Studium a hodnocení vlivu gelu s antibiotiky a bez antibiotik na proliferaci a viabilitu mesenchymálních kmenových buněk.
6. Studium a hodnocení disoluce antibiotik *ex vivo* z kostních štěpů, které byly impregnované gelem s obsahem gentamicinu a vankomycinu.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1. Muskuloskeletální infekce

Jako muskuloskeletální infekce označujeme infekční zánět pohybového aparátu. Jedná se o proces, kdy mikroorganismus, především bakterie, napadne tkáň svalů, kloubů, kostí či šlach.

Myositida

Nejčastější příčinou infekčního zánětu svalů (myositidy) je poranění, kvůli kterému patogen pronikne zdravou kůží, nebo se infekce rozvine z dříve vzniklé infekce kůže. Infekční myositida může dále vznikat na podkladě dekubitu nebo po operativním zákroku. Infekce svalu je závažné onemocnění, při němž postižená tkáň nekrotizuje, hrozí rozvinutí gangrény, otravy krve, septického šoku a následné smrti. Nejčastějšími původci jsou anaerobní bakterie jako grampozitivní *Clostridium*, fakultativně anaerobní grampozitivní *Streptococcus* či anaerobní gramnegativní *Bacterioides*. Infekce ran jsou povětšinou způsobené bakterií rodu *Staphylococcus*.^{1,2}

Osteomyelitida

K infekci kostní tkáně a kostní dřeni (ostemyelitidě) dochází u pacientů podstupujících chirurgický či ortopedický zákrok, nebo u pacientů s otevřeným zraněním. Infekční agens se do kosti může dostat i krevní cestou. Původcem je nejčastěji bakterie *Staphylococcus aureus*. Gramnegativní střevní bakterie (např. rod *Bacteroides*) způsobují nejčastěji infekční postižení obratlů. Osteomyelitidu u dětí způsobuje především *Streptococcus pyogenes*. Infekce může být i fungálního původu. V takovém případě je nejběžnějším patogenem rod *Candida*, mezi velmi vzácné původce se řadí např. rod *Aspergillus*.³ Iničiální terapie bakteriální infekce antibiotiky je empirická, po kultivaci se nasadí cílená antibiotická terapie.⁴

Tendinitida

Zánět šlach (tendinitida) je častým onemocněním pohybového aparátu, které vzniká nejčastěji na základě mechanického přetěžování šlachy.⁵ Méně často může být šlacha napadena patogenem, předně pyogenní bakterií (*Streptococcus*, *Staphylococcus*).⁶

V takovém případě mluvíme o hnisavém zánětu šlach, který nejčastěji vzniká přestupem infekce z okolních tkání na šlachu. Antibiotická terapie se nasazuje na základě kultivace infekčního agens.

Septická artritida

Septická artritida neboli infekční zánět kloubního prostoru může být způsobena nejen traumatem či chirurgickým zákrokem, vliv může mít také imunosuprese při terapii autoimunitních onemocnění (př. revmatická artritida), kdy pacientův organismus není schopen se dostatečně bránit vůči patogenům. Obdobně jako u osteomyelitidy bakteriální infekci kloubu způsobuje nejčastěji *Staphylococcus aureus*. Gramnegativní bakterie jako *Neisseria gonorrhoeae* je původcem u sexuálně aktivních jedinců, rod *Enterobacter* u starších pacientů.⁷ Dalším původcem jsou grampozitivní streptokoky. Virový či fungální původ onemocnění je vzácný a vyskytuje se nejčastěji jako komplikace u pacientů se sníženou imunitou, např. u HIV pozitivních.⁸ Postižení více kloubů současně (polyartikulární infekční artritida) se vyskytuje výjimečně.⁹

Specifickou a nejzávažnější komplikací ortopedických operací je infekční napadení tkáně po výměně kloubu. Patogen infikuje povrch rány i přes přísně sterilní provedení operace. Nejběžnějším patogenem je *Stafylococcus aureus* a *S. epidermidis*.¹ Bakterie vytváří na povrchu endoprotézy biofilm, který je významně odolný vůči mnoha antimikrobním látkám. Navíc je pro eradikaci biofilmu potřeba vyšší minimální inhibiční koncentrace antibiotika, než pokud by nebyl přítomný. Vyšších koncentrací se ale jen těžko dosahuje systémovým podáním antibiotik.¹⁰ Infekce umělého kloubu může nastat jak akutně, tedy bezprostředně po operaci, nebo je průběh mitigovaný (pozdní). Aby se předešlo infekci při náhradě kloubu, podávají se antibiotika již profylakticky.¹¹ Pokud propukne infekce, je nutné kromě antibiotické léčby také odstranění endoprotézy a nekrotické tkáně.^{1,10}

6.2. Léčba muskuloskeletálních infekcí

Léčba infekcí pohybového aparátu je obvykle kombinací systémové a lokální terapie. Ve většině případů systémové léčby bakteriální infekce se jedná o intravenózní podání antibiotik následované perorální antibiotickou léčbou.¹² Problémem systémové terapie je vysoká toxicita pro organismus pacienta. Lokální podávání antibiotik ve vhodné lékové formě je v tomto ohledu naopak výhodné. Touto cestou lze totiž dosáhnout

baktericidní koncentrace antibiotika v místě infekce, aniž by se zvyšovala systémová toxicita.¹² Lokální podávání antibiotik je nejen doplňkem systémové terapie, v některých případech ji může zcela nahradit. Vysoká koncentrace antibiotika v místě infekce umožní prostup účinné látky difúzí i na místa avaskulární, která jsou pro terapii podávanou systémově nedostupná.¹³ Lokální podávání antibiotik je specifické především jako profylaxe při ortopedických operacích. O lokálním podávání antibiotik v případě traumatu není zatím dostatek dat z klinických studií.¹⁰

Terapeutické systémy, které se využívají pro lokální terapii muskuloskeletálních infekcí, můžeme dle použitého nosiče dělit na dvě základní skupiny, a to nedegradabilní a biodegradabilní. Nedegradabilní nosiče, jako například polymethylmethakrylátové kostní cementy s obsahem gentamicinu, mají tu nevýhodu, že musí být po skončení uvolňování léčiva z místa aplikace odstraněny. Naproti tomu biodegradabilní terapeutické systémy se enzymaticky nebo neenzymaticky rozloží na metabolizovatelné degradační produkty. Tyto systémy poskytují prodloužené uvolňování antibiotika v místě infekce. Příkladem může být biodegradabilní kolagenní houba s gentamicinem.¹²

6.2.1. Nedegradabilní systémy

Nedegradabilní kostní cement jako nosič léčiv skýtá problém nejen v nutnosti jeho odstranění, ale i v horší schopnosti uvolňovat antibiotikum. Po aplikaci se léčivo uvolňuje burst efektem. Následně množství uvolněného antibiotika významně klesá, což může mít za následek až kolonizaci kostního cementu bakteriemi. Systém totiž představuje cizí těleso, na které bakterie adhezuje preferenčně a způsobí tak tvorbu biofilmu.¹²

Nedegradabilní kostní cementy jsou vyrobeny z methakrylátu.¹³ Polymethylmethakrylát (PMMA) impregnovaný antibiotikem je považován za zlatý standard v léčbě chronické osteomyelitidy.¹² Využíván je i profylakticky při ortopedických operacích, kde prokazatelně snižuje četnost infekcí. Pacienti pouze se systémovou profylaxí mají vyšší riziko nutnosti reoperace kvůli infikaci rány.¹² Výhodou PMMA je, že běžně nevyvolává imunitní reakci a pokryje široký povrch rány. PMMA je využíván ve formě kostního cementu nebo jako řetízkové segmenty (kuličky) impregnované antibiotikem. Dostupné jsou komerční formy PMMA,

například gentamicin PMMA beads Septopal[®], Biomet Deutschland, Berlín, Německo (Obr. 1), ale i nekomerční formy, kdy je PMMA impregnován antibiotikem při chirurgickém zákroku.¹²

Eluční vlastnosti závisí na porozitě PMMA a na typu antibiotika. Pro impregnaci se užívají antibiotika, která jsou dostatečně teplotně stabilní během vytvrzování polymeru, jako například aminoglykosidy a chinolony.¹³ Vybrané antibiotikum se také nesmí nevratně vázat na polymer.¹⁰ Inkorporované antibiotikum se v prvních hodinách uvolňuje z povrchu PMMA a objevuje se burst efekt. Celkové množství antibiotika uvolněného z cementu či kuliček je průměrně pouze 10%.¹⁴ PMMA lze kombinovat s fluoridem sodným, který přímo stimuluje proliferaci a diferenciaci osteoblastů.¹⁵



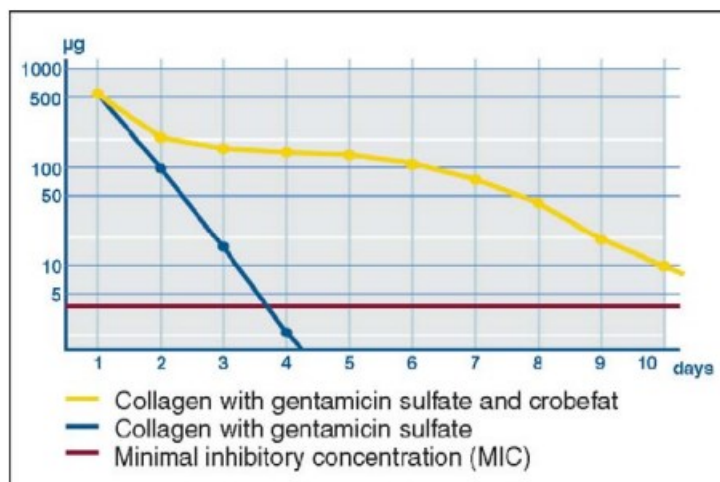
Obrázek 1: PMMA kuličky s gentamicinem (Septopal[®], Biomet Deutschland, Berlin, Germany)¹⁰

6.2.2. Biodegradabilní terapeutické systémy

Biodegradabilní systémy používané v terapii a profylaxi muskuloskeletálních infekcí není potřeba po uvolnění ATB z organismu odstraňovat. Uvolňování antibiotika může být prodlouženo na dobu nezbytnou k úplné eradikaci patogenu.¹² Prodloužené uvolňování antibiotika je zajištěno postupnou degradací polymeru *in vivo*. Antibiotikum se v iniciální fázi uvolňuje z povrchu systému a následně z vnitřních struktur kinetikou 1. řádu až do úplné degradace systému.¹³ Takto lze zajistit baktericidní koncentrace antibiotika po dostatečně dlouhou dobu bez rizika vzniku rezistence.¹⁶ Mezi nejčastěji používané biodegradabilní systémy pro lokální léčbu se řadí kolagenní houby, polymery a kopolymery kyseliny mléčné a glykolové, bioaktivní keramika nebo kostní štěpy.¹⁰

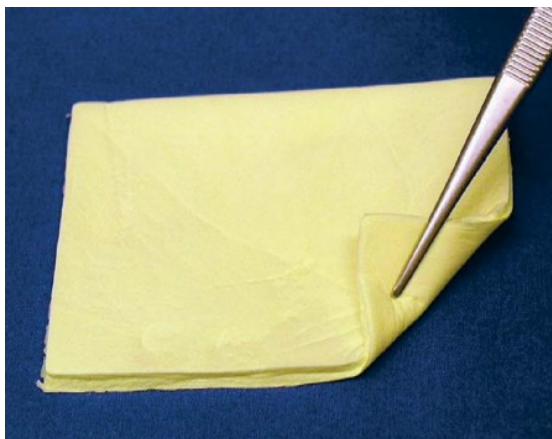
Kolagenní systémy

Kolagen je zcela degradabilní tělu vlastní protein, který je lidským organismem dobře tolerován. Na biodegradaci se podílí fagocyty a enzymolýza.¹⁰ Kolagenní systémy jsou komerčně dostupné, nejčastěji se vyrábí ze sterilizovaných hovězích šlach. Příkladem antibiotika inkorporovaného do kolagenní houby je gentamicin. V *in vitro* studiích se gentamicin-sulfát z kolagenního systému kompletně uvolnil již po 4 dnech.¹⁷ Pro prodloužení uvolňování antibiotika lze do kolagenní houby inkorporovat hydrofobními soli antibiotika. Příkladem je inkorporace gentamicinu do systému ve formě gentamicin-sulfátu a gentamicin-krobofátu, kdy došlo k prodloužení uvolňování gentamicinu na 12 dní (Obr. 2).^{10,12} Antibiotikum může být také enkapsulováno do liposomů.¹²



Obrázek 2: Uvolňování gentamicinu z kolagenu: kolagen impregnovaný gentamicin sulfátem v kombinaci s gentamicin-krobofátem (žlutá), kolagen s gentamicin-sulfátem (modrá), minimální inhibiční koncentrace (červená).¹⁰

Doba degradace kolagenního systému je přibližně 8 týdnů.¹² Příkladem komerčního kolagenního systému je Gentamicin-collagen fleece Septocoll[®], Biomet Deuschland, Berlín, Německo (Obr. 3).¹⁰



Obrázek 3: Gentamicin-collagen fleece (Septocoll[®], Biomet Deutschland, Berlin, Germany) – kolagen impregnovaný gentamicin-sulfátem v kombinaci s gentamicin-krofebátem¹⁰

Kopolymery kyseliny mléčné a glykolové

Kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) jsou dalším biodegradabilním materiálem, který hydrolyticky degraduje při fyziologickém pH a umožňuje prodloužené uvolňování antibiotik. Výběrem kopolymeru dané krystalinity, molekulové hmotnosti a konformace lze ovlivnit dobu degradace a tím i kinetiku uvolňování antibiotika.¹⁸ PLGA jsou kompatibilní s širokým spektrem antibiotik a jelikož se antibiotikum uvolní ve specifickém časovém rozmezí, lze se vyvarovat subterapeutickým koncentracím antibiotika v místě infekce. Mezi antibiotika inkorporovaná do PLGA patří například fluorochinolony a gentamicin. Antibiotikum se obecně z PLGA uvolňuje déle a ve vyšší koncentraci v porovnání s jinými systémy.¹² Uvolňování gentamicinu z PLGA bylo testováno na zvířecím modelu. Doba liberace inkorporovaného léčiva dosáhla 42 dnů.¹⁹

Bioaktivní keramika

Biokompatibilním systémem pro cílenou aplikaci léčiv jsou i porézní částice na bázi fosforečnanu vápenatého, jako je hydroxyapatit vápenatý nebo trikalcium fosfát. Považují se za bioaktivní, protože mají schopnost se v organismu vstřebat. Přípravu systému provádí lékař smísením antibiotika s materiálem.¹³ Porozita částic ovlivňuje rychlost uvolňování léčiva. Na zvířecím modelu bylo testováno uvolňování gentamicinu z částic hydroxyapatitu vápenatého. Doba uvolňování antibiotika dosáhla 90 dnů.²⁰ Dále lze do této skupiny zařadit i bioaktivní sklo,

jehož strukturním základem je oxid křemičitý. Bioaktivita spočívá v indukci reparace kostní tkáně podporou proliferace a diferenciaci osteoblastů.²¹

Do těchto materiálů lze inkorporovat gentamicin a další antibiotika.¹⁴

Kostní štěpy

Kromě syntetických systémů se také používají porézní alogenní kostní štěpy impregnované antibiotiky. Neexistuje standardní postup pro impregnaci kostních štěpů. Metod pro impregnaci existuje několik, stejně tak je velmi variabilní čas impregnace (v řádu minut až několika hodin). V literatuře jsou nejčastěji popsány dva typy impregnačních procesů. První metoda představuje manuální mísení kostních štěpů s antibiotikem ve formě prášku. Jiný postup popisuje impregnaci kostních štěpů v roztoku antibiotik.²² Lécivo se ze systému uvolňuje kinetikou 1. řádu, tedy v závislosti na koncentraci. Největší množství účinné látky se uvolní již během několika hodin.¹⁴ Kostní štěpy mají jak osteokonduktivní, tak osteoinduktivní vlastnosti. To znamená, že slouží jako strukturní opora pro nově tvořenou tkáň a zároveň stimulují proliferaci a diferenciaci kostních buněk.¹³ Protože impregnace štěpů probíhá za laboratorních podmínek, lze do štěpů impregnovat jakékoli antibiotikum. I u kostních štěpů hrozí riziko bakteriální kolonizace. Obdobně jako u kloubních implantátů, kostní štěp představuje cizí těleso, na které se bakterie preferenčně přichytí.²²

Kombinované terapeutické systémy

Terapeutické systémy bývají také kombinací různých biomateriálů. Příkladem mohou být porézní hydroxyapatitové částice potažené polykaprolaktonem, ve kterém je inkorporované antibiotikum.²³ Dalším příkladem jsou částice síranu vápenatého potažené PLGA s obsahem antibiotik.²⁴

Antibiotické potahy kloubních náhrad

Pro prevenci infekcí, které se mohou vyskytnout při totální endoprotéze, je vhodné zmínit použití kloubní náhrady potažené antibiotikem (Obr. 5).¹⁰ Kloubní náhrada bez antibiotického potahu je znázorněna na Obr. 4. Benefitem je uvolnění vysoké

koncentrace antibiotik v místě rizika infekce bez systémových nežádoucích účinků. Příkladem je potah z poly-D,L-laktátu (PDLLA) s gentamicinem.²⁵



Obrázek 4: Kyčelní náhrada bez antibiotického potahu²⁶



Obrázek 5: Kyčelní náhrada antibiotickým potahem¹⁰

Přes významné výhody systémů pro lokální dodání antibiotika existují i vedlejší nežádoucí účinky, například zpomalené hojení zlomeniny vlivem inhibice osteoblastů způsobené fluorochinolony. Byly stanoveny koncentrace, které mají negativní efekt na regeneraci kosti a tkání. Například vankomycin v koncentracích nižších než 1000 $\mu\text{g/ml}$ má minimální až žádný efekt na replikaci osteoblastů, naopak v koncentracích nad 10 000 $\mu\text{g/ml}$ způsobuje buněčnou smrt.^{27,13}

6.3. Gely jako depotní terapeutické systémy

Gely jsou polotuhé bikoherentní soustavy složené z gelujícího agens a disperzního média. Tyto dvě složky tvoří trojrozměrný systém tak, že gelující agens imobilizuje tekutinu a zabudovává ji do své gelové struktury.²⁸ Podle polaritě disperzního média se gely dělí na hydrogely a oleogely.²⁹

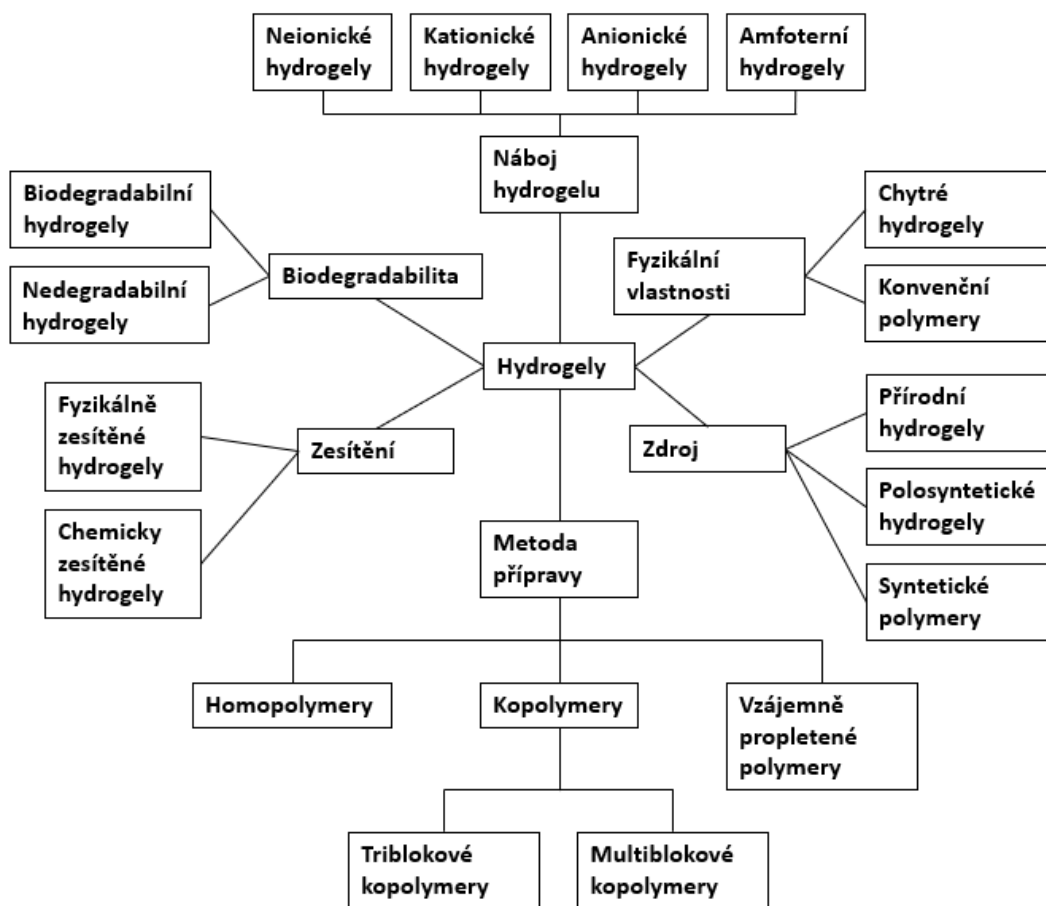
Kapalnou složkou hydrofilních gelů je nejčastěji voda, která často tvoří i více než 90 % celkové hmotnosti, nebo směs vody a alkoholů (propylenglykol, ethanol aj.). Gelující agens bývá nejčastěji organického původu. Hydrogely mohou být tvořeny buď jedním typem makromolekul, nebo směsí několika polymerů.²⁸

Hydrogely lze dělit dle interakcí ve struktuře na fyzikální a chemické. Ve struktuře fyzikálních gelů jsou přítomné pouze mezimolekulové interakce jako vodíkové vazby, iontové a hydrofobní interakce, interakce dipól-dipól, nebo je soudržnost založena na sterickém uspořádání molekul. Jsou reverzibilní, což znamená, že je gel schopný po odstranění a opětovném přidání rozpouštědla znovu bobtnat. Chemické gely, kde se na zesílení podílí kovalentní a iontové vazby, tuto schopnost nemají a označují se též jako gely ireverzibilní.³⁸ Detailní klasifikace hydrogelů je znázorněna na Obr. 6. Gelotvorné biodegradabilní hydrofilní polymery obsahují ve své struktuře hydrolyzovatelné skupiny, např. esterové nebo anhydridické. Enzymaticky katalyzovanou hydrolyzou takových vazeb v lidském organismu dochází k poklesu molekulové hmotnosti polymeru, což vede ke snížení pevnosti systému.³⁰

Hydrogely jsou biokompatibilní a netoxické díky jejich složení, kde je hlavní složkou voda, a díky mechanické a strukturální podobnosti s lidskými tkáněmi.²⁸ Další výhodou hydrogelů je jejich schopnost přizpůsobit se místě aplikace díky své deformovatelnosti. Bioadhezivní polymery jsou potom schopné se efektivně přichytit na nerovný povrch tkáně.³¹

Přírodní polymery mohou mít bakteriostatické vlastnosti, urychlovat hojení a také téměř nevyvolávají imunitní reakci. Mezi přírodní polymery schopné tvořit gely řadíme například kolagen, želatinu, chitosan či kyselinu hyaluronovou. Hydrogely na bázi syntetických polymerů či kopolymerů bioaktivní vlastnosti nemají, ale jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou lépe modifikovatelné.³²

Hydrogely mají i určité nevýhody. Vysoký obsah vody a velké póry ve struktuře mohou vést k relativně rychlé liberaci léčiva v rámci několika hodin či dní. Dále může být omezeno množství léčiva inkorporovatelné do hydrogelu, zvláště pokud se jedná o hydrofobní účinnou látku.³¹ Hydrogely přírodního původu mohou být kontaminované patogeny a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti nemusí být dostatečně uspokojivé.³²



Obrázek 6: Klasifikace hydrogelů, upraveno dle: SPIZZIRRI U., G., CIRILLO G.: *Functional hydrogels in drug delivery Key Features and Future Perspectives*³⁸

Pro dobrou kompatibilitu lze hydrogely aplikovat parenterálně (např. subkutánně, do peritonea aj.). V místě aplikace tvoří depo, které zajistí prodloužené uvolňování léčiva, a zároveň může chránit léčivo před enzymatickou degradací. Aplikace je nejčastěji injekční, proto je zapotřebí, aby měl gel vhodné reologické vlastnosti pro injekční aplikaci nebo aby ke gelaci došlo až v místě aplikace. Tyto požadavky splňují *in situ* gelující polymery. Gelováním, tedy vytvořením 3D struktury, je systém schopný zadržet molekuly léčivé látky ve své struktuře.^{33,34} Pro parenterální aplikaci lze využít některé stimuliresponzivní gely.³⁸

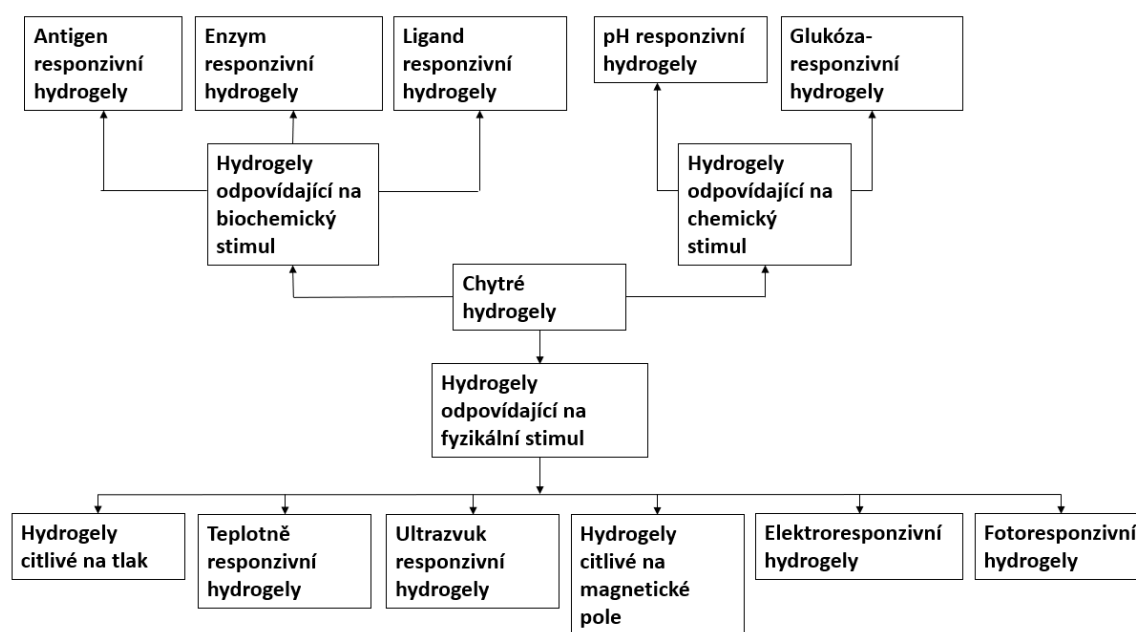
6.3.1. *In situ* hydrogely

Biodegradabilní *in situ* gely představují atraktivní terapeutický systém pro prodloužené uvolňování léčiva. Polymer rozpuštěný v organickém biokompatibilním rozpouštědle (např. dimethylsulfoxid) lze aplikovat ve formě roztoku injekčně. Po kontaktu polymerního systému s tělními tekutinami se vytvoří gel, případně pevný implantát. Gelaci přitom způsobí fyziologické podmínky v organismu pacienta (teplota, pH, přítomné ionty aj.). Léčivá látka obsažená v roztoku je po procesu gelace uchycená ve struktuře gelu a postupně se uvolňuje.^{37,28} Výhodou prodlouženého uvolňování léčiva je nižší frekvence aplikace léku, čímž se zvyšuje compliance pacienta.³⁵

Hydrogelový systém lze použít jak pro hydrofilní, tak pro hydrofobní léčiva.²⁸ Příkladem je termosenzitivní *in situ* gelující hydrogel chitosanu neutralizovaný β -glycerolfosfátem s obsahem paklitaxelu.³⁷

Perspektivní lékovou formou jsou nosní *in situ* gely pro systémové podání léčiv. Zajistí prodloužený kontakt léčiva se sliznicí, čímž se zvýší absorpce a biodostupnost v porovnání s roztokem léčiva, který je velmi rychle odstraněn mukociliární clearance a biodostupnost léčiva je tak výrazně nižší.³⁶ Nosní gely jsou tvořeny mukoadhezivními polymery. Mezi takové polymery se řadí pH senzitivní hydrogel polyethylenglykolu a kyseliny polymethakrylové, který bobtná v zásaditém či neutrálním prostředí přeměnou volných kyselých funkčních skupin.²⁸ K sol-gel přechodu po intranasálním podání může dojít i změnou teploty nebo v přítomnosti iontů. Příkladem je deacetylovaná klovatina gellan, která je schopná gelace po vystavení kationtům, jako je Na^+ , K^+ či Ca^{2+} , které jsou běžně přítomné v nosní sliznici. Nadějnými intranasálními formulacemi jsou *nose-to-brain* terapeutické systémy. Jedná se o neinvazivní podání léčiva, které se vstřebává nosní sliznicí a projde hematoencefalickou bariérou do mozku. Takový terapeutický systém je vhodný pro aktivní molekuly, které mají nízkou biodostupnost vlivem vysokého first-pass efektu, a pro molekuly málo rozpustné ve vodě. Příkladem je resveratrol, který prokázal protinádorový a antibakteriální účinek. Dále ho lze využít při prevenci neurodegenerativních onemocnění, např. Alzheimerovy choroby.³⁶

Stimuliresponzivní neboli chytré hydrogely jsou systémy široce využívané v lékových formách s prodlouženým či řízeným uvolňováním léčiv. Hlavním důvodem je jejich schopnost gelovat *in situ*. Interakce ve struktuře gelu lze na základě fyzikálního nebo chemického stimulu přerušit či znovu vytvořit, což má za následek schopnost gelu přecházet mezi dvěma fázemi (sol-gel).²⁸ Hydrofilní gely mohou měnit svoje fyzikální vlastnosti v závislosti na teplotě (poloxamery), pH (polyakryláty), změnách v elektrickém poli (polyakrylamid), světle (chitosan), v závislosti na působení enzymatických systémů (polykaprolakton), nebo v závislosti na koncentraci glukózy (Obr. 7).^{37,38} V případě systémů s léčivem lze přimísit účinnou látku do roztoku stimuliresponzivního polymeru *in vitro* a samotný hydrogel vniká až *in situ* po jeho podání do organismu.³⁸



Obrázek 7: Typy stimuliresponzivních hydrogelů, upraveno dle: SPIZZIRRI U., G., CIRILLO G.: *Functional hydrogels in drug delivery Key Features and Future Perspectives*³⁸

Termoresponzivní gely

Hydrofilní gely senzitivní na změnu teploty jsou nejatraktivnější pro terapeutické systémy. Za ideální teplotu gelace, která je zapříčiněna hydrofobními interakcemi, je považována fyziologická teplota těla, tedy 37°C. Za laboratorní teploty by se polymer

měl nacházet ve formě roztoku.³⁷ Přejít mezi fázemi vykazuje gel buď při nízké kritické teplotě roztoku (LCST), nebo při horní kritické teplotě roztoku (UCST). Termoresponzivní gely pak dělíme na negativně termoresponzivní, pozitivně termoresponzivní a termoreverzibilní.

Negativně termoresponzivní gely přechází z roztoku na gel při překročení LCST snížením rozpustnosti polymeru. Příkladem takového gelu je Poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAM).³⁷ PNIPAM polymerizovaný s povidonem (PVP) do triblokového kopolymeru PNIPAM-b-PVP-b-PNIPAM tvoří ve vodě rozpustný hydrogel. Při zahřívání se tvoří mezi doménami PNIPAM hydrofobní interakce, přičemž PVP zůstává stále rozpustný ve vodě. Ke gelaci dochází při 37 °C.³⁹ Opakem jsou pozitivně termoresponzivní hydrogely, které při poklesu pod UCST gelovají, jako například polymery kyseliny akrylové.

Termoreverzibilní gely tvoří např. poloxamery. Tento polymer je schopný gelovatět při teplotě těla, snížením teploty na 25°C je pak schopný opět přecházet na sol. Jedná se o triblokové kopolymery polyethylenoxidu (PEO) a polypropylenoxidu (PPO) PEO-PPO-PEO známé pod obchodními názvy Pluronic® nebo Tetronic®.³¹ Difúze léčiva z poloxameru je poměrně rychlá, doba uvolňování je limitována influxem vody, která rozpouští polymer. Difúzi léčiva lze ovlivnit kovalentním zesíťováním, které zpomalí rapidní rozpouštění polymeru *in vivo*. Alternativně lze poloxamer zakončený aminovými skupinami modifikovat navázáním sacharidových struktur, například kyselinou hyaluronovou, čímž se zpomalí degradace polymeru a dojde k prodloužení uvolňování léčiva z polymerní matrix.^{31,40,41}

Jiným typem amfifilu je kopolymer polyethylenglykolu (PEG) s PLGA (PEG-PLGA-PEG), popř. PLGA-PEG-PLGA, kde PLGA představuje hydrofobní doménu. Takové kopolymery mají vyšší teplotu gelovatění, proto se s nimi před samotnou aplikací do organismu lépe manipuluje. Doba uvolňování léčiva je oproti poloxameru delší. Uvolňování hydrofilních léčiv probíhá difúzí. Liberace hydrofobních látek je zpočátku také řízená difúzí, ale poté je řízená hlavně degradací polymeru.³¹

pH responzivní gely

Gely citlivé na změnu pH obsahují ve své struktuře kyselé či bazické skupiny, které odštěpují či váží proton v závislosti na okolním pH. Slabě kyselé polymery

(anionické, př. karbomery – Carbopol®) gelování při zvyšování pH, slabě zásadité polymery (kombinace karbomeru a HPMC nebo směs polymethylakrylátu a polyethylenglykolu) gelování naopak při snižování pH.³⁷

Elektroresponzivní gely

Základem elektroresponzivního gelu je polyelektrolyt, díky kterému je hydrogel schopný smršťovat se či bobtnat vlivem elektrického proudu. Modulací elektrického signálu dochází k řízenému uvolňování léčiva z gelu. Stejně tak jsou citlivé na změny pH, které způsobují ionizaci funkčních skupin a tím zapříčiňují přechod mezi fázemi. Příkladem elektroresponzivního gelu je alginát vápenatý v kombinaci s polyakrylovou kyselinou.⁴²

Fotoresponzivní gely

Zesílení polymeru lze dosáhnout působením fotonů. Tuto schopnost mají fotoresponzivní polymery, v jejichž struktuře je nutná přítomnost chromoforů.⁴³ Polymery mohou být citlivé jak na viditelné světlo, tak na dlouhovlnné UV záření. Bezpečnější jsou polymery citlivé na viditelnou oblast světla. Krátkovlnné UV záření prostupuje tkáněmi minimálně a je zdraví škodlivé.³⁷ Hlavní nevýhodou takových polymerů je pomalá reakce na spouštěč gelace. Příkladem fotoresponzivního gelu je chitosan. Používá se jako oční terapeutický systém, který je podán ve formě roztoku a v oku po ozáření UV zářením zgelovává.²⁸

6.3.1. Uvolňování léčiv z polymerních gelů

Uvolňování léčiva z gelové matrice závisí na mnoha faktorech, jako je například typ polymeru, léčiva a pomocných látek, velikost pórů v polymerní síti, postup přípravy terapeutického systému nebo podmínky v organizmu.⁴⁴

Interakce mezi molekulou léčivé látky a hydrogelovou strukturou výrazně ovlivňuje dobu uvolňování léčiva z matrice. Účinná látka může být v gelu navázána slabšími fyzikálními interakcemi. Příkladem je želatina modifikovaná aminokyselinami, na kterých je iontovými interakcemi navázaný lysozym.

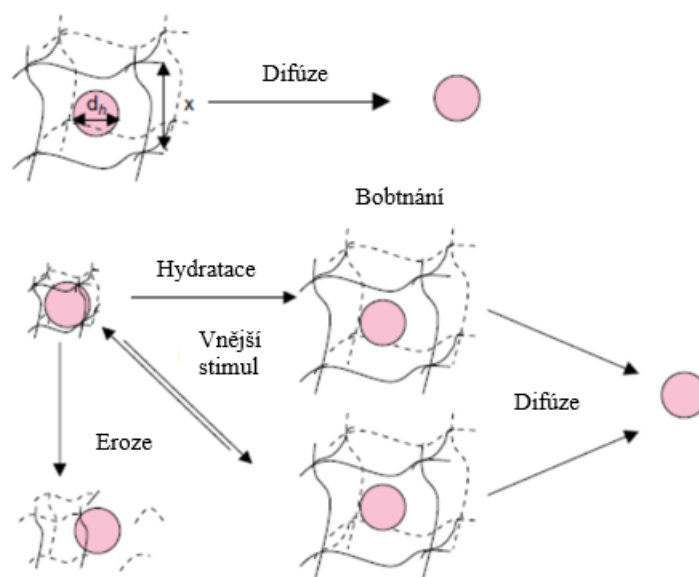
Léčivou látku lze k polymeru konjugovat i kovalentně. Potom je uvolňování látky z polymeru ovlivněno především enzymatickým a chemickým štěpením vazeb mezi

lčivem a polymerem. Jako příklad lze uvést dexametason navázaný na monoakrylátový polyethylenglykol. Využívá se pro podporu diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk.³¹

Pokud hydrogel nepodléhá degradaci nebo významným změnám objemu, léčivo se uvolňuje v závislosti na difúzním koeficientu. Koeficient difúze je určen velikostí a tvarem molekuly léčiva, interakcí léčiva s polymerní sítí a viskozitou gelu. Difúze pobíhá dle Fickova zákona. Stupeň zesítnění a velikost ok polymerní sítě má rovněž vliv na liberaci. Pokud je molekula léčiva větší než velikost ok, lék se z matrice neuvolňuje. V případě, že je velikost ok dostatečně velká, rychlost uvolnění pak závisí na délce cesty přes gel.

V gelech, které erodují, je liberace léčiva řízena degradací polymeru a štěpením vazeb mezi polymerem a molekulou aktivní látky.

Uvolňování léčiv ze stimuliresponzivních gelů je pak ovlivněno nejen degradací, ale stejně jako gelace i změnami podmínek, na které je hydrogel citlivý (Obr. 8).⁴⁵



Obrázek 8: Uvolňování léčiv z gelu, upraveno dle: ALVAREZ-LORENZO, C., CONCHEIRO, A.: *Effects of surfactants on gel behavior. American Journal of Drug Delivery*⁴⁵

6.3.2. Hydrogely s antimikrobiálním účinkem

Hydrogely s antimikrobním účinkem se široce využívají pro biomedicínskou aplikaci. Používají se pro potah močových a jiných katetrů, kontaktních čoček, kloubních a zubních implantátů, pro lokální terapii a další. Takové hydrogely mohou mít antimikrobiální aktivitu buď samy o sobě, nebo je do nich inkorporováno antibiotikum či jiné částice schopné eliminovat patogen. Řízené uvolňování antimikrobní látky z hydrogelu je způsobeno citlivostí hydrogelu na vnější podnět a jeho biodegradabilitou.^{46,54}

Hydrogely s nanočásticemi kovů

Hydrogely s nanočásticemi stříbra, zlata či oxidu zinečnatého vykazují antimikrobiální efekt. Jejich biokompatibilita pro implantaci u člověka je ale neuspokojivá.

Stříbro se využívá v obvazech, antimikrobních textiliích i v kostních implantátech. Účinek má proti širokému spektru patogenů, a to i proti rezistentním bakteriím, kvasinkám a virům. Stříbro lze inkorporovat do přírodních i syntetických polymerů. Mezi přírodní řadíme polysacharidy, jako je alginát, chitosan či karboxymethylcelulosa. Alginát se stříbrnými částicemi je zesíťován iontovými interakcemi pomocí Ca^{2+} iontů. Ze syntetických polymerů se využívá polyakrylamid (PAM), polyvinylacetát (PVA), PEG, včetně jejich derivátů a další. Konkrétním příkladem je hydrogel sodné soli kyseliny 2-akrylamido-2-methylpropanosulfonové s Ag nanočásticemi, který lze získat pod komerčním názvem Acticoat™ (Smith & Nephew, Londýn, Velká Británie).^{46,54}

Zlaté nanočástice jsou schopné navázat se na bakteriální membránu a způsobit její penetraci, což vede k smrti bakterie. Na rozdíl od stříbrných nanočástic jsou polymery se zlatými nanočásticemi vzácné. Jako příklad lze uvést zlaté částice s navázaným ampicilinem, které baktericidně působí i na rezistentní bakterie vč. methicilin-rezistentního *Staphylococcus aureus*. Oproti stříbru není zlato toxické pro osteoblasty. Polymer, do kterého lze částice inkorporovat, je například N-isopropylakrylamid.⁴⁶

Oxid zinečnatý se mohutně využívá v kosmetických přípravcích s antibakteriálním účinkem. Dále se s ním lze setkat antimikrobních potazích tvořených PNIPAM na biomedicínská zařízení. Hydrogel má baktericidní účinek proti *Escherichia coli* a nevykazuje cytotoxicitu vůči savčím buňkám.^{46,54}

Hydrogely s antibiotiky

Antibiotika jsou inkorporována do hydrogelů přírodních i syntetických. Hydrogelové lékové formy lze používat lokálně přímo do infikované oblasti, což umožňuje výrazné snížení dávky a snížení rizika antibiotické rezistence. Také je pak omezená systémová toxicita antibiotika.^{46,54}

Do hydrogelové matrice lze včlenit ciprofloxacin. Ciprofloxacin je antibiotikum ze skupiny fluorochinolonů. Účinnost má proti širokému spektru grampozitivních i gramnegativních bakterií. Lze jej inkorporovat do hydrogelu vytvořeného polymerizací kyseliny aminofenylboronové v PVA, který se používá k hojení ran u diabetiků. Polyakrylátový hydrogel s ciprofloxacinem se ve formě potahu na implantátu používá pro prevenci infekcí spojených s implantací. Antibiotikum se z terapeutického systému uvolňuje dlouhodobě.^{46,54}

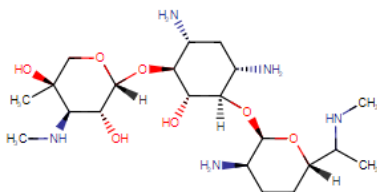
Gentamicin (Obr. 9) je aminoglykosidové antibiotikum, které je kvůli své systémové toxicitě a nízkým plazmatickým koncentracím aplikováno především lokálně. Působí bakteriostaticky či baktericidně na gramnegativní bakterie, včetně rodu *Pseudomonas*, a na grampozitivní *Staphylococcus*. Antimikrobiálně nepůsobí na anaeroby. Jeho nejzávažnějším nežádoucím účinkem je ototoxicita a nefrotoxicita. Mechanismem účinku je inhibice syntézy proteinů vazbou na 30S podjednotku ribozomu. Gentamicin ve formě sulfátu má iontový charakter. Jedná se o kation, který může s anionaktivními látkami tvořit inkompatibility.^{47,48}

Na zvířecím modelu byl testován termoresponzivní hydrogel tvořený kyselinou hyaluronovou modifikovanou molekulami PNIPAM. V jeho struktuře byl inkorporován gentamicin. Tento terapeutický systém zabraňoval vzniku infekce u otevřených zlomenin, a zároveň se u něj neprokázal negativní vliv na hojení fraktury kosti.⁴⁹

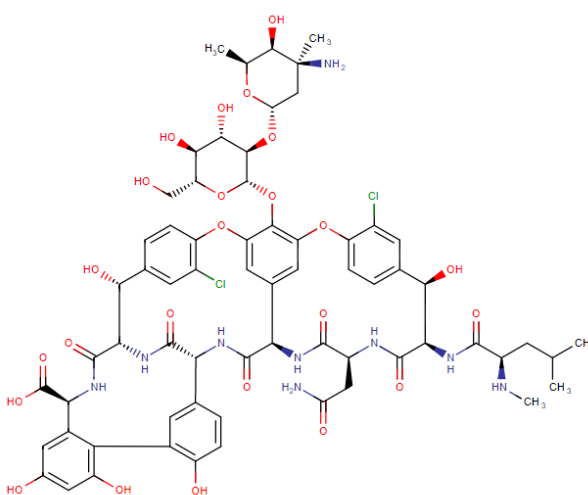
Vankomycin (Obr. 10) je glykopeptidové antibiotikum s úzkým antimikrobním spektrem. Bakteriostaticky až baktericidně působí na grampozitivní bakterie včetně MRSA. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny bakterie. Působí synergicky s aminoglykosidovými antibiotiky. Obdobně jako u gentamicinu je hlavním nežádoucím účinkem ototoxicita a nefrotoxicita, proto je nutná zvýšená opatrnost při jejich kombinaci. Jedná se o antibiotikum poměrně stabilní, které tvoří

ve vodě roztok s nízkým pH. Inkompatibilita pak může vznikat při mísení vankomycinu s roztokem o zásaditém pH.^{50,51}

Terapeutické systémy s obsahem vankomycinu lze využít lokálně jako prevenci či terapii muskuloskeletálních infekcí a infekcí spojených s ortopedickými operacemi. Příkladem hydrogelu s vankomycinem je pluronic- α -cyklodextrin, který je aplikovatelný injekčně.^{46,54}



Obrázek 9: Chemická struktura gentamicinu⁵²



Obrázek 10: Chemická struktura vankomycinu⁵³

Polymery s vlastní antimikrobiální aktivitou

Některé polymery vykazují samy o sobě antibakteriální aktivitu. Jejich využití je hlavně topické při léčbě ran. Antimikrobiální účinek vykazují pH senzitivní a teplotně senzitivní hydrogely vytvořené na základě kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) a kyseliny itakonové.

Ionické hydrogely ničí specifickými interakcemi bakteriální membránové struktury, což vede k buněčné smrti. Řadíme mezi ně polymery jako kationické polykarbonáty nebo polyakryláty.^{54,46}

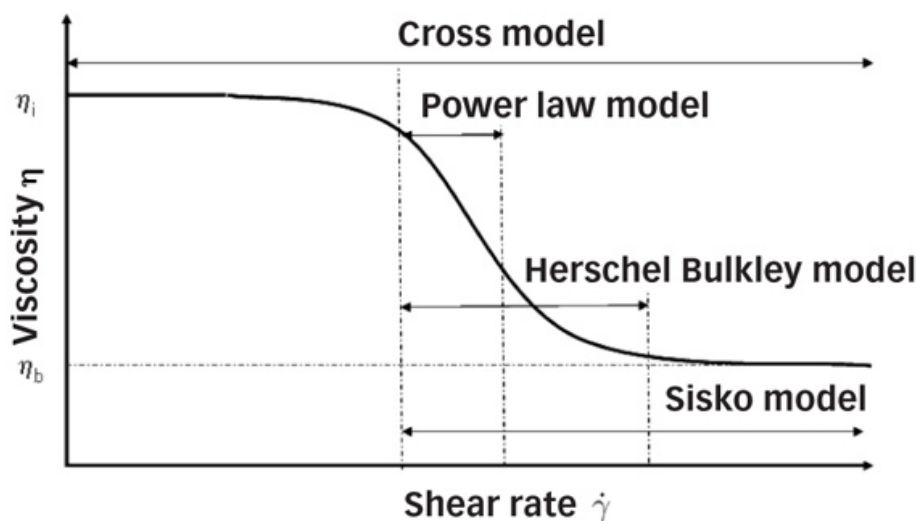
6.4. Reologické chování gelů

Gely jsou z reologického hlediska charakterizované jako nenewtonské viskoelastické soustavy s bikoherentní 3D strukturou typickou pro pevné látky (*solid like*). Reologické vlastnosti se testují rotačními a oscilačními testy.

Tokové vlastnosti

Gely jako polotuhé soustavy mají plastický typ toku, ke kterému dochází až po překročení tzv. *meze toku*. Gely mohou být tixotropní, vykazovat reverzibilní izotermní přeměnu gel – sliz – gel, způsobenou mechanickým namáháním. Regenerace struktury gelu je hysterezní, tedy opožděná.⁵⁵

Tokové křivky charakterizující základní reologické chování gelů lze analyzovat pomocí vhodných reologických modelů. Je tak možné popsat tvar a zakřivení křivky a předvídat chování gelu i při rychlostním spádu, který přímo měřen nebyl. Mezi nejběžnější modely užívané pro popis tokových křivek nenewtonských kapalin se řadí *Power law*, *Cross*, *Herschel-Bulkley* a *Sisko model* (Obr. 11). Viskozitu ovlivňuje významně teplota, molekulová hmotnost, tlak a další charakteristiky.^{56,57}



Obrázek 11: Toková křivka a vybrané reologické modely popisující její tvar⁵⁷

Matematický vzorec pro mocninný (Power law) reologický model:⁵⁸

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n$$

(1)

σ	posuvné napětí [Pa]
K	koeficient konzistence [Pa·s ⁿ]
$\dot{\gamma}$	rychlostní spád [s ⁻¹]
n	index tokového chování [-]

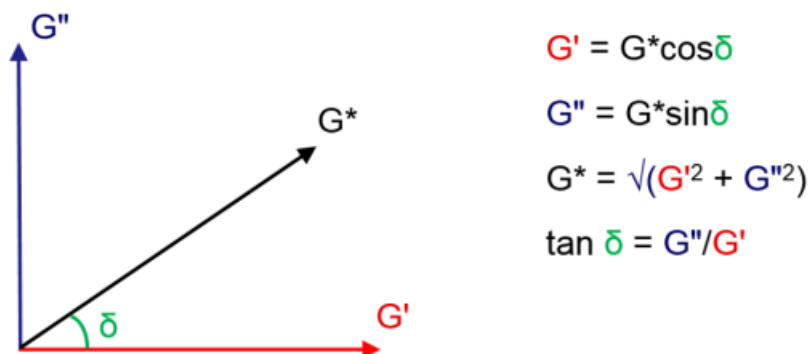
Při velmi nízkém namáhání může soustava vykazovat konstantní viskozitu, tzv. newtonské plató (*zero shear viscosity plateau*). Tuto část tokové křivky lze popsat Newtonským reologickým modelem, který se používá především pro matematický popis chování newtonských kapalin (př. voda, minerální oleje). Ty vykazují konstantní viskozitu při dané teplotě a tlaku nezávisle na rychlostním spádu či posuvném napětí. Se zvýšením rychlostního spádu nad kritickou hodnotu pak viskozita nenewtonských kapalin prudce klesá nebo stoupá. Tuto část tokové křivky lze matematicky popsat mocninným vztahem (*Power law model*) (viz. rovnice 1). Pokud je Power law index $n > 1$, materiál vykazuje dilatantní chování, $n < 1$ značí pseudoplastické chování, $n = 1$ mají newtonské kapaliny s konstantní viskozitou. Při velmi vysokém rychlostním spádu je viskozita opět konstantní, jedná se o tzv. *infinite shear viscosity plateau*. *Sisko model* je vhodný pro popis oblasti s klesající viskozitou a následnou ustálenou viskozitou (*infinite shear viscosity plateau*). *Cross model* lze použít pro popis celé tokové křivky, pokud jsou pro tento model z naměřených dat dostupné potřebné informace.^{56,57,59}

Viskoelastické vlastnosti

Pro hodnocení viskoelastického chování gelů je vhodné použít nedestruktivní oscilační testy, které pro testovaný gel představují v porovnání s rotačními testy výrazně mírnější namáhání. Vzorek umístěný mezi geometrie rotačního reometru podléhá oscilačně kmitavým pohybům horní geometrie podle zadaného rozsahu amplitudy a frekvence. Oscilačními testy lze získat informace o tuhosti, pružnosti, strukturální pevnosti a deformaci vzorku.⁶⁴

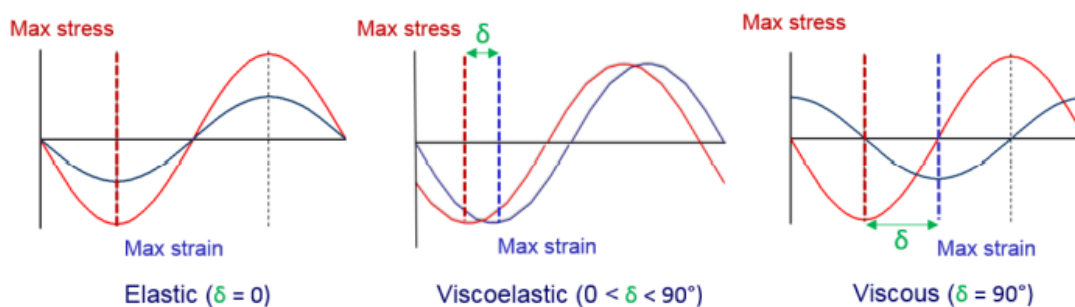
Elastický modul G' charakterizuje míru elasticity soustavy. Soustava je tím pevnější, čím má elastický modul vyšší hodnotu. Viskózní modul G'' pak vyjadřuje ochotu gelu vykonávat tok. Porovnáním G' a G'' lze určit, zda se soustava chová jako tekutina či jako pevná látka. Pokud je $G' > G''$, jedná se o viskoelastické pevné soustavy. Při $G'' > G'$ se jedná o viskoelastické tekutiny. Geometrická závislost mezi G' a G'' je znázorněna na Obr.12. Při mírném namáhání jsou elastický a viskózní modul konstantní, jedná se o tzv. lineární viskoelastickou oblast (*linear viscoelastic region*, LVER).⁶⁰ S rostoucí deformací pak dochází z narušení vnitřní struktury gelu a poklesu

hodnoty modulů. Komplexní modul G^* charakterizuje tuhost materiálu. Čím je hodnota G^* vyšší, tím je materiál pevnější.^{62,63}



Obrázek 12: Geometrická závislost mezi G' a G'' ⁵⁷

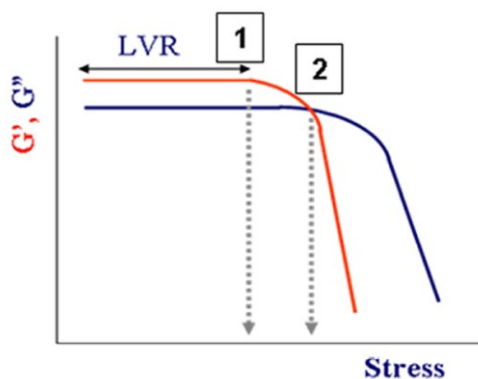
Fázový úhel δ udává stupeň pružnosti soustavy. Nabývá hodnot od 0° do 90° , kdy nulové hodnoty značí ideálně elastický materiál, hodnoty mezi 0° a 45° značí určitý stupeň viskózního tlumení materiálu a fázový úhel 90° je typický pro ideálně viskózní látku. Fázový posun mezi deformací a napětím při oscilačním namáhání je znázorněn na Obr. 13.



Obrázek 13: Grafické znázornění fázového úhlu⁵⁷

Některé materiály, jako například polotuhé přípravky, nejsou schopné toku, dokud není překročena kritická hodnota aplikovaného napětí. Tato hodnota se nazývá mez toku (tzv. *yield point*). Mez toku je definována jako napětí, které musí být aplikované na vzorek, aby začal téct.

Pokud je napětí nižší, materiál se pouze elasticky deformuje. Napětí nad mezí toku způsobí, že vzorek teče jako kapalina. Stanovení meze toku pomocí oscilačních testů je přesnější než při použití rotačních testů. Mez toku lze rovněž označit jako bod, kdy hodnota $G' = G''$ (překřížení modulů, Obr. 14), jelikož v tomto okamžiku se vzorek přestává mít charakter pevné látky a začíná se chovat jako kapalina.^{61,62,63,64}



Obrázek 14: Diagram zobrazující oblast lineární viskoelastivity (1) a mez toku (2)⁶¹

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. Použité suroviny

Alogenní kostní štěpy z hlavice femuru, *Tkáňová banka Fakultní nemocnice Hradec Králové, Česká republika*

Aqua pro injectione, *Fresenius Kabi*

Dextran Mr ~ 40 000, *Sigma-Aldrich Co.*

Gentamicinum 80 mg/2 ml, *Lek*, injekční/infuzní roztok

I-Carrageenan, *Sigma-Aldrich Co.*

Makrogol 300, *Sigma-Aldrich Co.*

Methocel K100M, *Colorcon GmbH*

Povidon 25, *Fagron a.s.*

Rybí želatina CE IT 2 gel, *Sigma-Aldrich Co.*

Vankomycini hydrochloridum 500 mg, *Mylan*, prášek pro infuzní roztok

Želatina p.a., *Penta s.r.o.*

7.2. Použité přístroje

Analytické váhy, *KERN ABS*, max. 220 g, d = 0,1 mg, Německo

Digitální váhy, *KERN PCB*, max. 6000 g, d = 0,1 g, Německo

Laboratorní ohřívací plotna, *Severin*, Německo

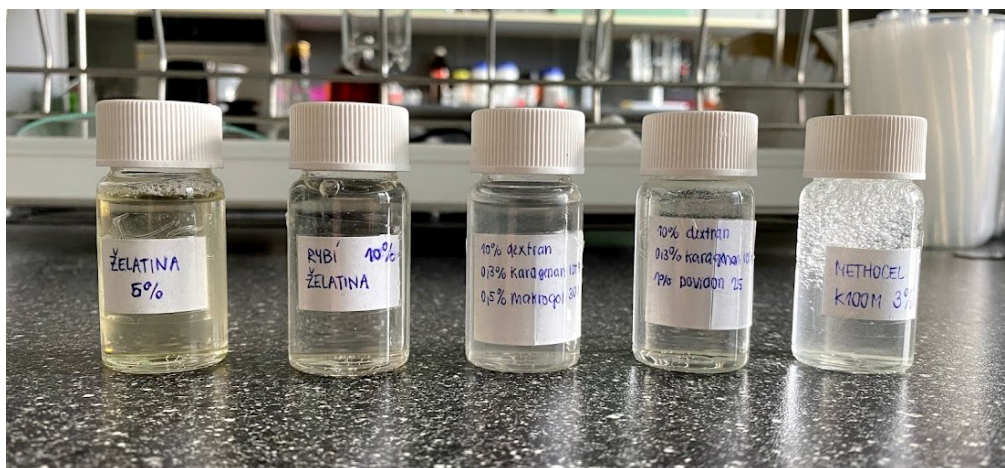
Magnetická míchačka, 200 – 1500 ot./min., *Steinberg*, Německo

Rotační reometr Kinexus, *Malvern*, Velká Británie

7.3. Přehled vzorků

Tabulka 1: Přehled připravených gelů včetně provedených testů

Označení	Pomocné látky	Koncentrace	Účinné látky	Testy
M 1%	methocel K100M	1 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
M 1% ATB	methocel K100M	1 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	tokové vlastnosti viskoelastické vl. disoluční test
M 3%	methocel K100M	3 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
M 3% ATB	methocel K100M	3 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	disoluční test viabilita proliferace
KM	dextran makrogol 300 i-karagenan	10 % 0,5 % 0,3 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
KM ATB	dextran makrogol 300 i-karagenan	10 % 0,5 % 0,3 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	
KP	dextran povidon 25 i-karagenan	10 % 1 % 0,3 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
KP ATB	dextran povidon 25 i-karagenan	10 % 1 % 0,3 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	
Ž	želatina	5 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
Ž ATB	želatina	5 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	
RŽ	rybí želatina	10 %		tokové vlastnosti viskoelastické vl.
RŽ ATB	rybí želatina	10 %	vankomycin 500 mg gentamicin 80 mg	disoluční test



Obrázek 15: Připravené gely

7.4. Postup přípravy vzorků

7.4.1. Příprava gelů hypromelosy

Metodou řízeného bobtnání bylo připraveno 20,0 g 1 % a 3 % hypromelosového gelu. Do 50 ml kádinky bylo naváženo 10,0 g vody na injekci a zahřáto na 90 °C. Na hladinu horké vody na injekci bylo postupně nasypáno 0,20 g, resp. 0,60 g methocelu K100M. Disperze byla míchána pomocí magnetické míchačky. Po hydrataci částic methocelu byla doplněna voda na injekci laboratorní teploty do celkové hmotnosti 20,0 g. Disperze byla uložena do chladničky, aby došlo k úplnému rozpuštění methocelu. Bylo připraveno 10,0 g hypromelosového gelu s antibiotiky. Bylo použito 7,0 g vody na injekci zahřáté na 90 °C, na jejíž hladinu bylo nasypáno 0,10 g, resp. 0,30 g methocelu K100M. Ke 2 ml roztoku gentamicinu byl přidán 1 ml vody na injekci a za stálého míchání bylo rozpuštěno 500 mg vankomycinu. Roztok antibiotik byl postupně za stálého míchání přidán do vodné disperze methocelu. Disperze byla uložena do chladničky pro dokonalé rozpuštění methocelu.

7.4.2. Příprava gelů iota karagenanu

Do kádinky o objemu 50 ml bylo naváženo 10,0 g vody na injekci. Voda byla zahřáta na 50 °C. Za stálého míchání na magnetické míchačce bylo přidáno 0,060 g iota karagenanu. Po rozpuštění iota karagenanu byly přidány 2,0 g dextranu, který byl opět rozpouštěn za stálého míchání. Dále bylo naváženo 0,10 g makrogolu 300, resp. 0,20 g povidonu 25, který byl pečlivě vmísen do připravovaného vzorku. V případě disperze

s makrogolem 300 bylo pro úpravu pH do neutrálního použito 0,040 g hydrogenfosforečnanu didraselného. Připravený vzorek byl doplněn do celkového množství 20,0 g vodou na injekci.

Gely s antibiotiky v množství 10,0 g byly připraveny tak, že do 8,0 g gelu připraveného výše popsanou metodou byly za stálého míchání přidány 2,0 ml roztoku gentamicinu obsahujícího 80 mg účinné látky a 500 mg vankomycinu ve formě prášku, který byl rozpouštěn mícháním na magnetické míchače.

7.4.3. Příprava gelů želatiny

Bylo připraveno 20,0 g 5 % glycerogelu želatiny. Byl navážen 1,0 g želatiny a přidáno 6,50 g vody na injekci. Želatina byla ponechána 15 minut bobtnat. Bylo přidáno 12,50 g glycerolu 85 % a na vodní lázni při teplotě 65-70 °C se nechala želatina rozpustit. Byla dovážena odpařená voda do celkové hmotnosti 20,0 g, soustava byla zhomogenizovaná a umístěna do chladničky.

Dále bylo připraveno 20,0 g 10 % gelu rybí želatiny. Byly naváženy 2,0 g rybí želatiny a následně bylo přidáno 18,0 g vody pro injekci. Bobtnání probíhalo 15 minut za laboratorní teploty, poté byla zbobtnalá želatina umístěna na vodní lázeň a nechala se rozpustit při teplotě 65-70 °C. Byla dovážena odpařená voda a důkladně promísený gel byl umístěn do chladničky.

Bylo připraveno 10,0 g 5 % gelu želatiny a 10,0 g 10 % gelu rybí želatiny s obsahem 80 mg gentamicinu a 500 mg vankomycinu. Postup byl stejný pouze s tím rozdílem, že želatina, resp. rybí želatina, bobtnala v roztoku antibiotik. Tento roztok byl připraven smísením 2,0 ml roztoku gentamicinu s obsahem 80 mg účinné látky, 500 mg vankomycinu ve formě prášku a 1 ml vody na injekci.

7.5. Měření tokových vlastností

Pro měření tokových vlastností gelů byl použit absolutní rotační reometr Kinexus Pro+ (Malvern Instruments, UK) se softwarem r-Space for Kinexus. Byla zvolena geometrie kužel-deska CP2/20. Vzorky byly měřeny při teplotě 37 °C a rychlostním spádu v rozsahu od 0,1 s⁻¹ do 100 s⁻¹. Každý vzorek byl standardně nanesen dle pokynů sekvence *Load sample*. Bylo odebráno přebytečné množství vzorku (trimerace) a geometrie byly zakryty termostabilním krytem. Byl spuštěn test *Toolkit_V005 Shear rate ramp – Alternative flow curve*. Po ukončení testu byl vzorek odstraněn pomocí

sekvence *Unload sample*. Parametry testu přehledně uvádí Tab. 2. Byly měřeny vždy tři nově nanesené vzorky. Získané tokové křivky byly matematicky popsány mocninným modelem (Power law, Rovnice 1) a byly vyjádřeny hodnoty koeficientu konzistence K ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$), indexu tokového chování n (-) a viskozity η_{10} při rychlostním spádu 10 s^{-1} ($\text{Pa}\cdot\text{s}$). Byl vypočten průměr a směrodatná odchylka průměru ze tří realizovaných testů.

Tabulka 2: Nastavení parametrů při měření tokových vlastností

Typ geometrie	CP2/20
Teplota	37 °C
Rozsah rychlostního spádu	0,1 s^{-1} – 100 s^{-1}
Test	Toolkit_V005 Shear rate ramp – Alternative flow curve

7.6. Měření viskoelastických vlastností

Na absolutním rotačním reometru Kinexus Pro+ (Malvern Instruments, UK) byly testovány rovněž viskoelastické vlastnosti gelů. Byla zvolena geometrie deska – deska PU20 a vzdálenost mezi horní a dolní geometrií (tzv. gap) byla zvolena 1 mm. Frekvence kmitání byla nastaven na 1 Hz a amplituda 0,1 až 100 %. Teplota při měření byla udržována na 37 °C. Parametry nastavené při měření jsou přehledně uvedeny v Tab. 3. Nanesení vzorku, trimerace a odstranění vzorku probíhalo dle instrukcí softwaru r-Space for Kinexus. Pro měření a vyhodnocení viskoelastických vlastností byl zvolen test *rSolution_0017 Evaluating product texture using oscillatory testing*, jehož součástí jsou analýzy *Peak and Valley Analysis* a *Yield Stress Determination*. Viskoelastické vlastnosti byly hodnoceny dle průběhu elastického modulu G' (Pa), viskozního modulu G'' (Pa) a fázového úhlu δ (°). Tuhost gelu byla hodnocena na základě hodnot komplexního modulu G^* (Pa), stupeň elasticity, a tedy pružnost soustavy byla vyjádřena hodnotou fázového úhlu δ (°) a strukturální pevnost pomocí meze toku σ' (Pa). Byly měřeny vždy tři nově nanesené vzorky. Byl vypočten průměr a směrodatná odchylka průměru ze třech hodnot uvedených hodnotících parametrů.

Tabulka 3: Nastavení parametrů při měření viskoelastických vlastností

Test	rSolution_0017 Evaluating product texture using oscillatory testing
Typ geometrie	PU20
Teplota	37 °C
Frekvence	1 Hz
Amplituda	0,1 – 100 %
Gap	1 mm

7.7. Hodnocení proliferace a viability buněk *in vitro*

Hodnocení proliferace a viability mezenchymálních kmenových buněk *in vitro* po aplikaci gelu s antibiotiky bylo realizováno a vyhodnoceno v Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Kostní dřev (BM) byla získána od dárce bez komorbidit podstupujícího totální náhradu kyčelního kloubu v důsledku osteoartritidy. Izolované plně charakterizované mezenchymální kmenové buňky BM (MSC) byly ošetřeny podle standardních operačních protokolů, jak bylo popsáno dříve (Procházka et al., 2010).⁶⁵ Pro testování byly připraveny blank 3 % hypromelosový gel a gel s 500 mg vankomycin-hydrochloridu a 200 mg gentamicin-sulfátu, kterým byly po dobu 30 min impregnovány kostní štěpy.

7.8. Disoluční testy gentamicinu a vankomycinu

Pro disoluční testy byl připraven 1 % a 3 % hypromelosový gel a 10 % gel rybí želatiny. Formulace obsahovaly obsahovaly 500 mg vankomycin-hydrochloridu a 200 mg gentamicin-sulfátu na 10 g gelu. 1,0 g alogenních štěpů z hlavičky femuru (Tkáňová banka Fakultní nemocnice, Hradec Králové, Česká republika) rozdrobněných na malé části bylo impregnováno po dobu 30 minut v 2,0 g gelu, který obsahoval 40 mg gentamicin-sulfátu a 100,0 mg vankomycin-hydrochloridu. Impregnované kostní štěpy byly přeneseny do dialyzační trubičky o nominální MWCO 6000 – 8000 a o průměru 14,6 mm (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vzorky byly umístěny do vialek a bylo přidáno 15,0 ml disolučního média, kterým byl fosfátový pufr (PBS) pH 7,4. Vialky byly umístěny do třepací vodní lázně, která byla předehřátá na 37 °C. Amplituda třepání byla nastavena na 15 mm s frekvencí třepání 70 min⁻¹. Ve 24 hodinových intervalech bylo odebráno disoluční médium a nahrazeno novým. Stanovení vancomycinu a gentamicinu bylo realizováno na Ústavu klinické

biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové metodou fluorescenční imunoanalýzy (FIA).⁶⁶

8. VÝSLEDKY A DISKUZE

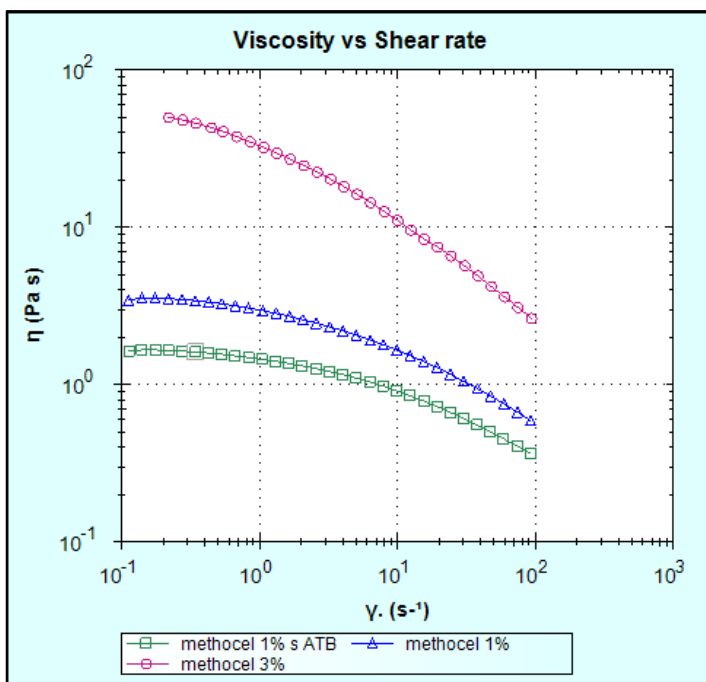
Předložená diplomová práce byla realizována ve spolupráci s ortopedickou klinikou a Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové, Přírodovědeckou fakultou Univerzity Hradec Králové a Ústavem histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Doposud téma lokálně aplikovaných terapeutických formulací pro léčbu muskuloskeletálních infekcí nebylo zpracováváno v rámci katedry Farmaceutické technologie Univerzity Karlovy. Předmětem diplomové práce bylo připravit hydrofilní gely jako potenciální nosiče antibiotik, které by poskytly jejich prodloužené uvolňování v místě aplikace. Gely byly použity na impregnaci kostních štěpů, které se aplikují do rány při chirurgickém zákroku. Doposud byly kostní štěpy impregnovány především v roztoku antibiotik, nebo se připravily smícháním štěpů s antibiotiky ve formě prášku.¹³ Takové formulace ale neumožňují dostatečně dlouhé uvolňování antibiotika pro eradikaci patogenu, a zároveň dochází v prvních hodinách k výraznému burst efektu. Vysoká iniciální dávka může působit až toxicky na okolní tkáň, např. na osteoblasty.¹⁴ Cílem je formulovat systém s nižším burst efektem a prodlouženou liberací léčiva. Hydrogely s těmito vlastnosti se již podařilo připravit, a to i ve formě injekční.⁶⁷ Další výhodou impregnace kostních štěpů v hydrogelu by mohl být fakt, že omezí přichycení bakterií na strukturu štěpu a zabrání tak vytvoření rezistentního biofilmu.

Složení gelů (viz. Tab. 1) bylo zvoleno na základě jejich biokompatibility, biodegradability, vhodnosti pro parenterální podání a rovněž zkušeností s formulací disperzí polymerů pro matricové systémy na pracovišti katedry Farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Současně lze připravené gely sterilizovat a případně lyofilizovat.

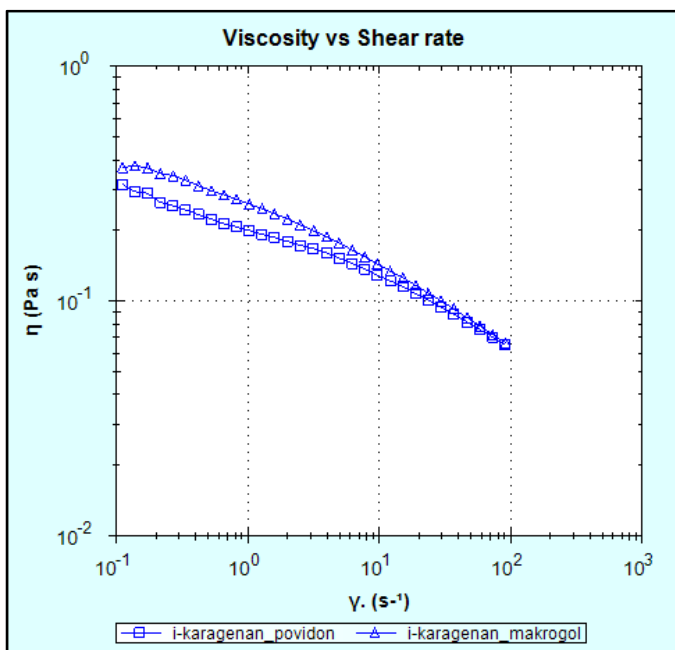
Postup přípravy gelů byl zvolen dle vlastností daného polymeru. Množství antibiotik, které bylo do gelů inkorporováno, bylo zvoleno dle požadavků ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Gely byly charakterizovány měřením tokových a viskoelastických vlastností, které významně ovlivňují průběh impregnace kostních štěpů, formulaci adhezivního protektivního filmu na jejich povrchu a zajistí prodloužené uvolňování inkorporovaných antibiotik. V modifikovaném disolučním testu *ex vivo* byl sledován průběh liberace antibiotik.

8.1. Tokové vlastnosti disperzí polymerů

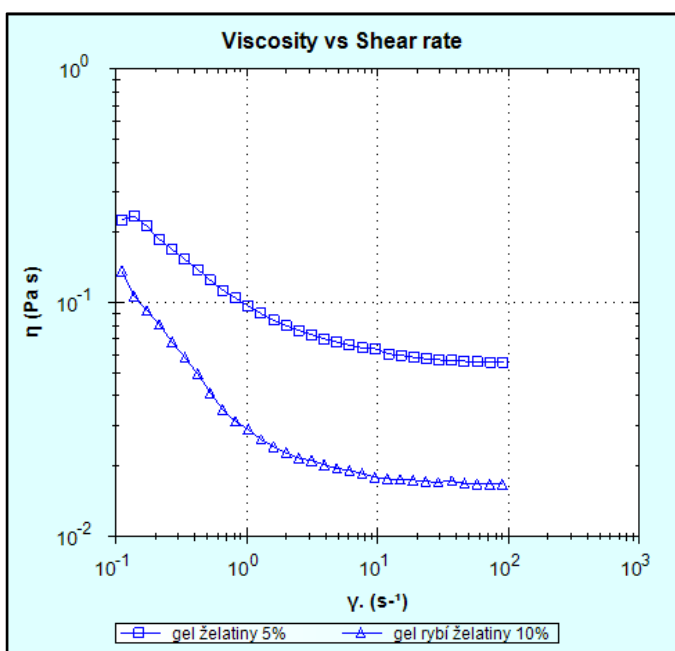
Tokové vlastnosti byly hodnoceny rotačními testy pomocí sekvence *Toolkit_V005 Shear rate ramp/Alternative flow curve*. Byly získány nerovnovážné tokové a viskozitní křivky (Obr. 16 až 18). Z jejich průběhu je patrné, že s rostoucím namáháním viskozita jednotlivých polymerních disperzí klesá. Při nízkých hodnotách rychlostního spádu je u 1 % hypromelosových disperzí patrné tzv. newtonské plató, *zero shear* neboli *at rest* viskozita, oblast konstantní viskozity následovaná poklesem viskozity vlivem rostoucího rychlostního spádu, což je typické pro kapalné soustavy. U 3 % disperze hypromelosy, disperze karagenanu a želatiny newtonské plató není, proto se dá předpokládat, že se jedná o soustavy strukturované, vykazující mez toku, což bude ověřeno oscilačními testy.



Obrázek 16: Viskozitní křivky hypromelosových disperzí: 3 % methocel, 1 % methocel blank, 1 % methocel s antibiotiky



Obrázek 17: Viskozitní křivky gelů iota-karagenanu



Obrázek 18: Viskozitní křivky gelů želatiny

Lineární část viskozitních křivek byla matematicky popsána mocninným modelem. Hodnoty korelačního koeficientu blíží se jedné potvrzují vhodnost zvoleného modelu. Byly získány hodnoty koeficientu konzistence K ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), indexu tokového chování n (-) a viskozity η_{10} při rychlostním spádu 10 s^{-1} ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), které slouží pro porovnání tokových vlastností testovaných formulací (Tab. 4 – 10).

Tabulka 4: Analýza tokových křivek hypromelosového gelu 1 %

Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	5,68	0,4365	0,9947	1,664
2	5,88	0,4835	0,9939	1,838
3	6,27	0,4296	0,9984	1,637
Průměr	5,94	0,4499		1,713
SD	0,30	0,0293		0,109

Tabulka 5: Analýza tokových vlastností hypromelosového gelu 1 % s ATB

Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	1,98	0,6549	0,9966	0,9139
2	2,69	0,5547	0,9907	0,9871
3	2,80	0,5303	0,9889	0,9307
Průměr	2,49	0,5800		0,9439
SD	0,45	0,0660		0,0383

Tabulka 6: Analýza tokových křivek hypromelosového gelu 3 %

Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	82,31	0,4129	0,9917	24,6
2	89,83	0,3840	0,9888	19,9
3	90,24	0,4177	0,9906	22,9
Průměr	87,46	0,4049		22,5
SD	4,46	0,0182		2,4

Tabulka 7: Analýza tokových vlastností gelu iota-karagenanu s makrogolem 300

Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	0,249	0,7377	0,9989	0,1439
2	0,253	0,7421	0,9990	0,1486
3	0,224	0,7619	0,9991	0,1393
průměr	0,242	0,7472		0,1439
SD	0,016	0,0129		0,0047

Tabulka 8: Analýza tokových vlastností gelu iota-karagenanu s povidonem 25

Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	0,200	0,7800	0,9994	0,1287
2	0,224	0,7600	0,9995	0,1374
3	0,228	0,7350	0,9997	0,1290
průměr	0,217	0,7583		0,1317
SD	0,015	0,0225		0,0049

Tabulka 9: Analýza tokových vlastností gelu želatiny 5 %

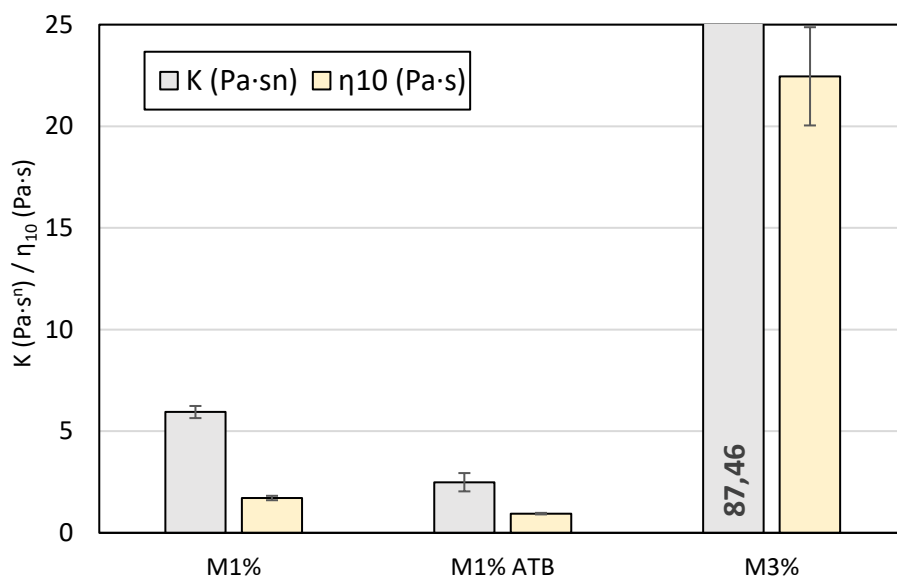
Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	0,113	0,7814	0,9949	0,06352
2	0,132	0,7238	0,9892	0,06301
3	0,100	0,8213	0,9966	0,06245
Průměr	0,115	0,7755		0,0630
SD	0,016	0,0490		0,0005

Tabulka 10: Analýza tokových vlastností gelu rybí želatiny 10 %

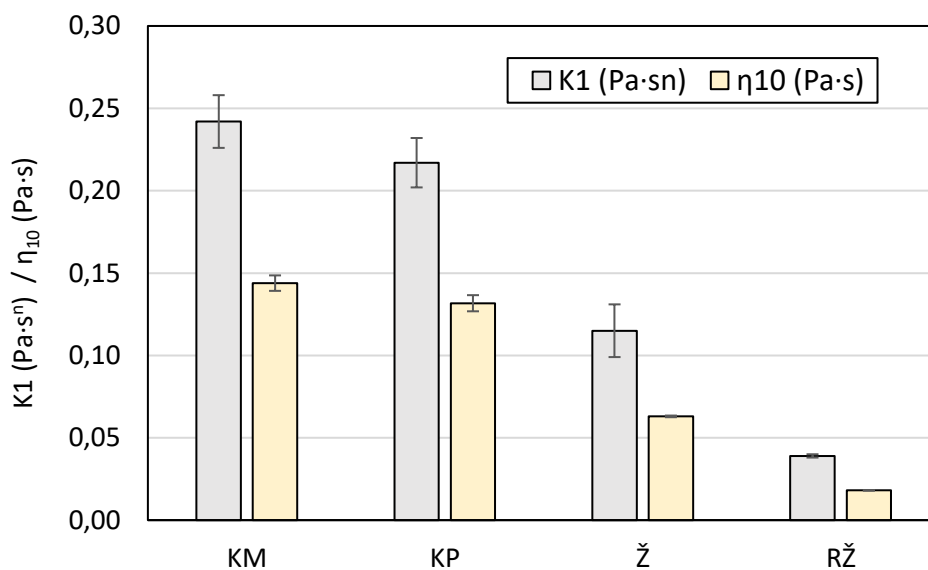
Měření	K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Corr.	η ₁₀ (Pa·s)
1	0,039	0,7197	0,9818	0,01796
2	0,040	0,7121	0,9823	0,01822
3	0,039	0,7239	0,9839	0,01807
Průměr	0,039	0,7186		0,0181
SD	0,001	0,0060		0,0001

Formulace byly porovnávány pomocí koeficientu konzistence, který vyjadřuje viskozitu v klidu. Číselně je jeho hodnota rovna viskozitě při rychlostním spádu 1 s⁻¹. Nejvyšší hodnotu koeficientu konzistence má 3 % hypromelosový gel. Při porovnání 1 % disperze hypromelosy bez antibiotik a s inkorporovanými antibiotiky je patrné, že přídavek antibiotik snižuje koeficient konzistence (Obr. 19). Významně nižší hodnoty koeficientu konzistence vykazovaly disperze iota karagenanu a želatiny (Obr. 20).

Hodnota dynamické viskozity při rychlostním spádu 10 s^{-1} je důležitá při aplikaci gelu nebo impregnaci kostních štěpů gelem. Představuje viskozitu formulace při mírném namáhání. Rozdíl v hodnotách koeficientu konzistence a viskozitě při rychlostním spádu 10 s^{-1} je tím vyšší, čím je vyšší viskozita a koreluje s hodnotami indexu tokového chování. Na základě rovnice mocninného modelu je možné vypočítat viskozitu i při jiných rychlostních spádech, které odpovídají různým technologickým operacím nebo způsobům aplikace (např. injekční aplikaci).

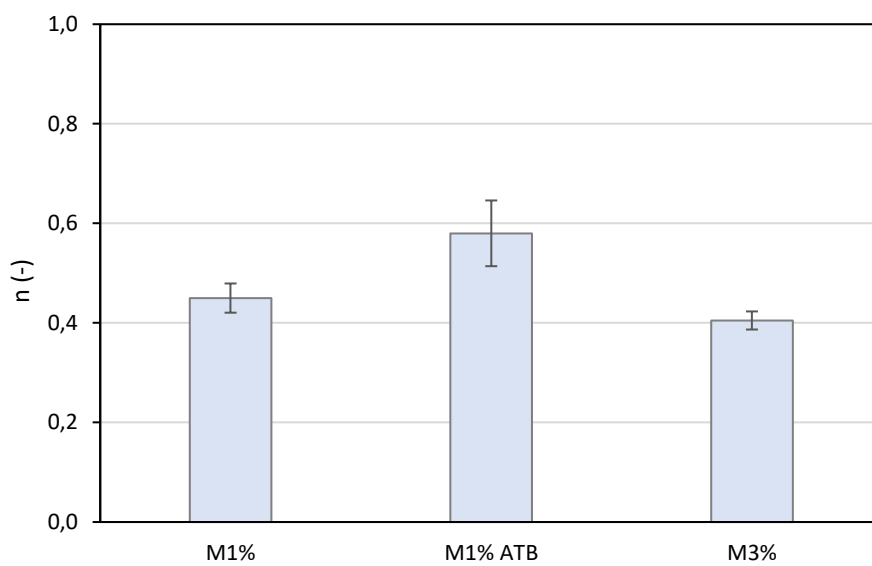


Obrázek 19: Koeficient konzistence K a viskozita η_{10} gelů hypromelosity

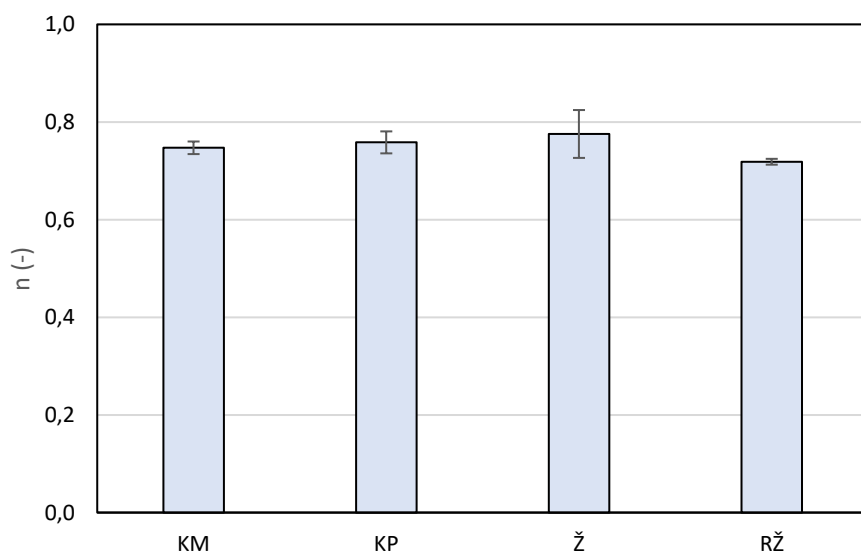


Obrázek 20: Koeficient konzistence K a viskozita η_{10} gelů iota-karagenanu a želatiny

Dle hodnot indexu tokového chování, který byl nižší než 1, lze všechny připravené formulace charakterizovat jako nenevtonské soustavy. Nejnižší hodnota $n \sim 0,4$ byla zjištěna u 3 % hypromelosové disperze. Lze předpokládat, že se bude jednat o gel s bikoherentní strukturou, což bude ověřeno oscilačními testy. Struktura 1 % disperze hypromelosy bez antibiotik je citlivější k namáhání než disperze obsahující antibiotika (Obr. 21). Vyšší hodnoty indexu tokového chování byly zjištěny u disperzí iota karagenanu, želatiny a rybí želatiny. Pohybují se v úzkém rozmezí 0,72 až 0,77 (Obr. 22). Jejich chování se nejvíce blíží toku ideální kapaliny.



Obrázek 21: Index tokového chování n gelů hypromelosy

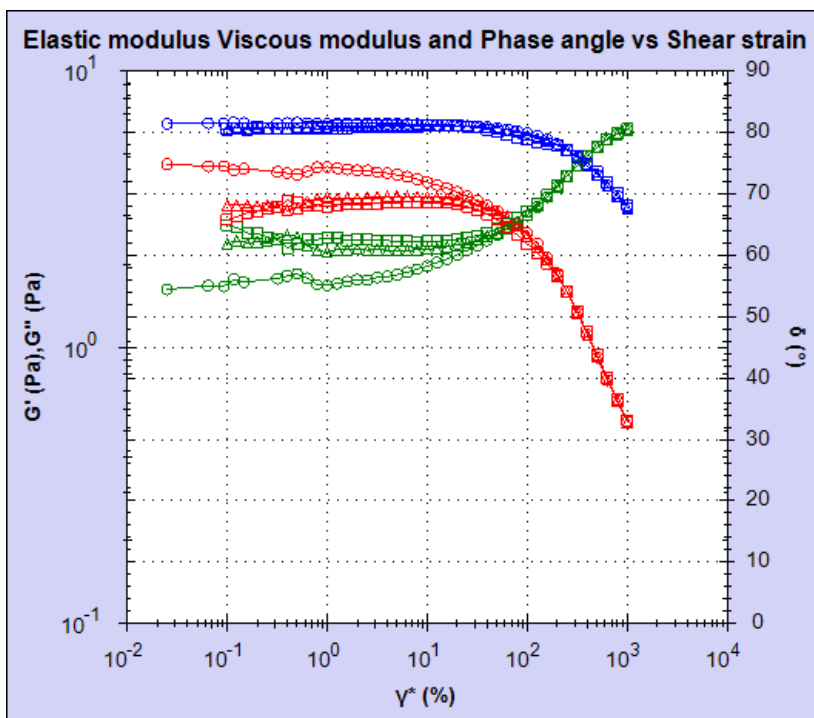


Obrázek 22: Index tokového chování n gelů iota-karagenanu a želatiny

8.2. Viskoelastické vlastnosti

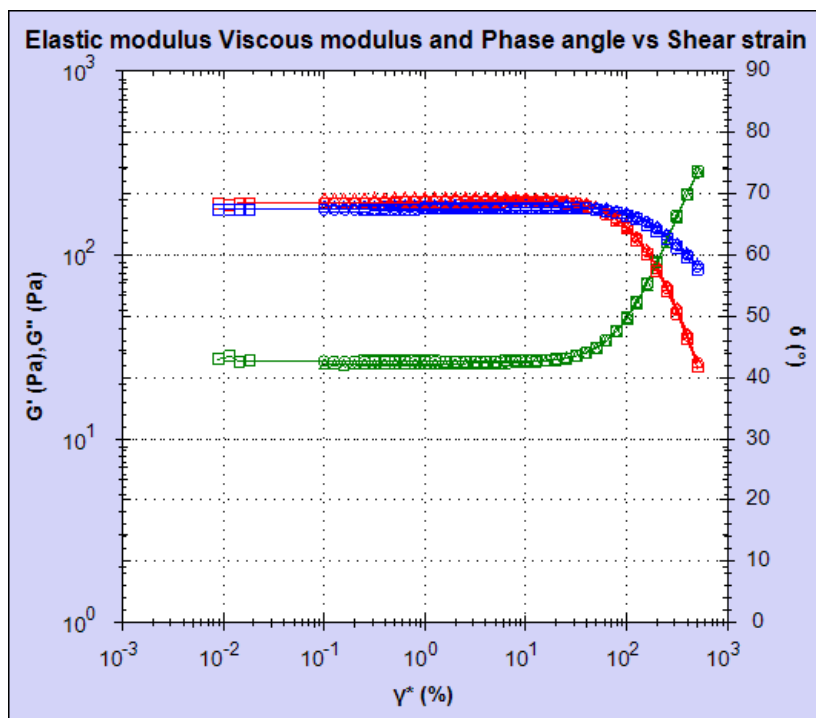
Byly hodnoceny viskoelastické vlastnosti formulovaných disperzí pomocí testu *rSolution_0017 Evaluating product texture using oscillatory testing*. Oscilační testy jsou obecně pro testování reologických vlastností gelů vhodnější než testy rotační, které mohou nevratně narušit strukturu gelu.

Byl získán průběh elastického modulu, viskózního modulu a fázového úhlu v závislosti na oscilačním namáhání testovaných formulací. Na Obr. 23 až 25 jsou prezentovány charakteristické průběhy modulů a fázového úhlu testovaných formulací. 1 % hypromelosová disperze má vyšší hodnoty viskózního modulu než modulu elastického, jedná se o viskoelastickou kapalinu (liquid-like). To potvrzuje hodnota fázového úhlu vyšší než 45° (Obr. 23, Tab. 11).



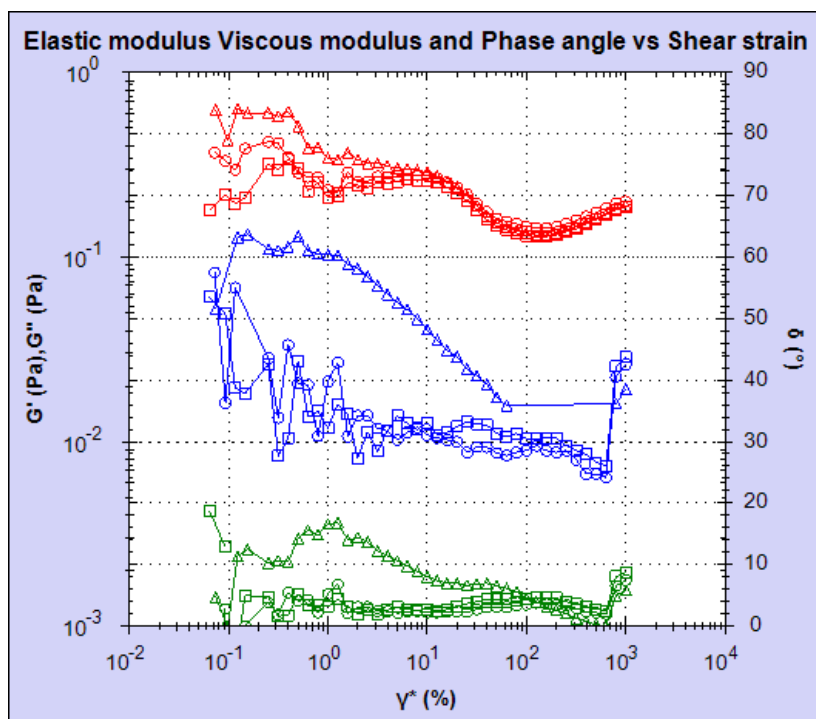
Obrázek 23: Průběh *elastického modulu* (červeně), *viskózního modulu* (modře) a *fázového úhlu* (zeleně) methocelu 1 % s antibiotiky

Zajímavé jsou průběhy modulů a hodnoty fázového úhlu pro 3 % disperzi hypromelosity. Na Obr. 24 si lze povšimnout pouze malého rozdílu mezi průběhem viskózního a elastického modulu. Dalo by se říci, že se jedná o soustavu, jejíž viskoelastické vlastnosti jsou na pomezí kapaliny a pevné látky. Fázový úhel je dle Obr. 24 a hodnot v Tab. 13 nepatrně nižší než 45° , což by potvrzovalo chování viskoelastické pevné látky.



Obrázek 24: Průběh *elastického modulu* (červeně), *viskózního modulu* (modře) a *fázového úhlu* (zeleně) methocelu 3 %

Disperze rybí želatiny o koncentraci 10 % se dle průběhu elastického a viskózního modulu chová jako viskoelastická pevná látka (Obr. 25). Viskózní modul je výrazně nižší než modul elastický. Tento fakt potvrzuje i hodnota fázového úhlu 5° (Tab. 17).



Obrázek 25: Průběh *elastického modulu* (červeně), *viskózního modulu* (modře) a *fázového úhlu* (zeleně) gelu rybí želatiny 10 %

Struktura gelů byla hodnocena na základě komplexního modulu G^* , fázového úhlu δ a meze toku σ' . Hodnoty těchto charakteristik jsou uvedeny v Tab. 11 – 17.

Tabulka 11: Analýza viskoelastických vlastností 1 % methocelu K100M

Měření	G^* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	17,89	56,24	27,89
2	13,72	54,47	22,91
3*	32,53	31,45	12,35
průměr	15,81	55,36	25,40
SD	2,95	1,25	3,52

* hodnoty nebyly započteny do průměru

Tabulka 12: Analýza viskoelastických vlastností K100M 1 % s ATB

Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	6,53	64,92	5,43
2	6,86	64,22	5,36
3	6,83	64,35	5,38
průměr	6,74	64,50	5,39
SD	0,18	0,37	0,04

Tabulka 13: Analýza viskoelastických vlastností methocelu 3 % K100M

Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	265,60	42,75	162,50
2	277,00	42,61	173,60
3	269,60	42,78	168,50
průměr	270,73	42,71	168,20
SD	5,78	0,09	5,56

Tabulka 14: Analýza viskoelastických vlastností gelu iota-karagenanu s makrogolem 300

Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	0,99	56,21	2,619
2	0,96	56,92	2,540
3	0,96	57,47	2,575
průměr	0,97	56,87	2,578
SD	0,02	0,63	0,040

Tabulka 15: Analýza viskoelastických vlastností iota-karagenanu s povidonem 25

Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	0,87	60,90	2,46
2	0,88	64,70	2,82
3	0,77	60,80	2,36
průměr	0,84	62,13	2,55
SD	0,06	2,22	0,24

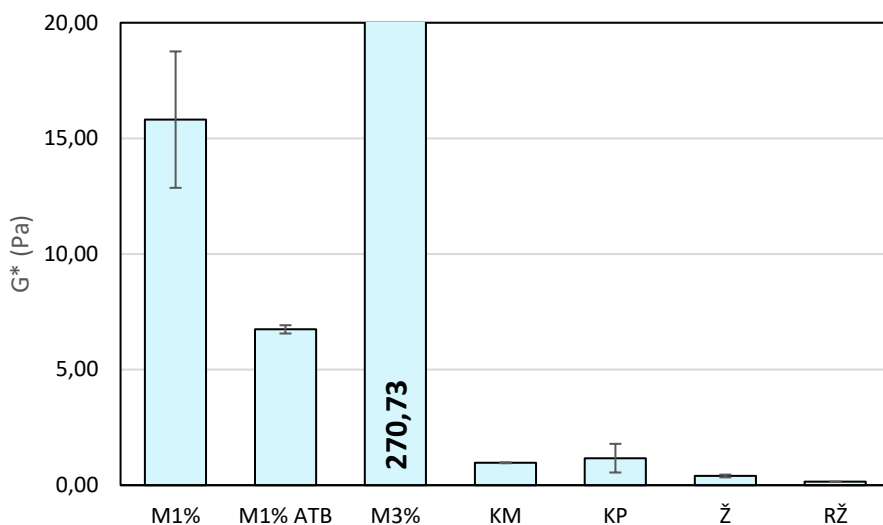
Tabulka 16: Analýza viskoelastických vlastností gelu želatiny 5 %

Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	0,44	66,38	1,96
2	0,33	62,32	1,96
3	0,43	68,19	1,98
průměr	0,40	65,63	1,97
SD	0,06	3,01	0,01

Tabulka 17: Analýza viskoelastických vlastností gelu z rybí želatiny 10 %

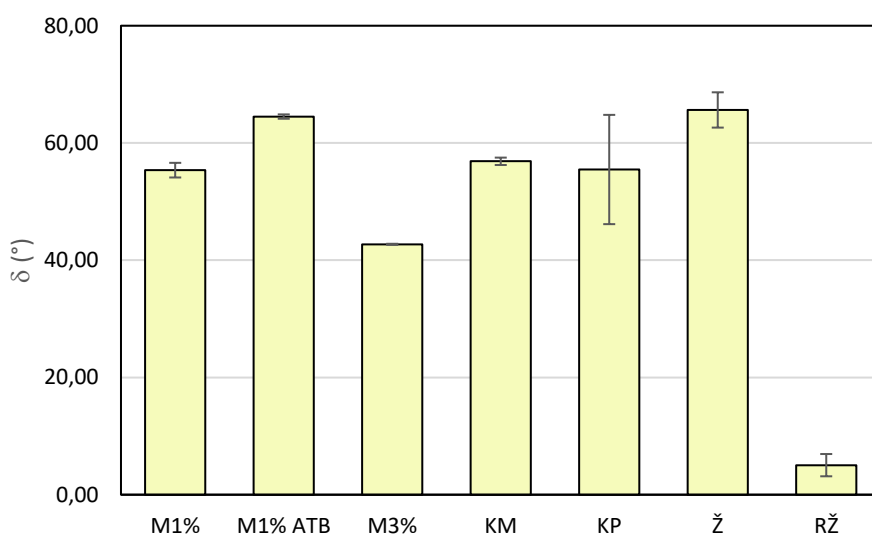
Měření	G* (Pa)	δ (°)	σ' (Pa)
1	0,13	4,57	1,86
2	0,14	7,13	1,93
3	0,15	3,42	2,00
průměr	0,14	5,04	1,93
SD	0,01	1,90	0,07

Tuhost gelu lze charakterizovat pomocí komplexního modulu G*. Tuhé gely vykazují vysoké hodnoty G*. Tuhost gelů je porovnána na Obr. 26. Nejtuhší je 3 % hypromelosový gel, jehož hodnoty G* ~ 271 Pa. Vzhledem k tomu, že 1 % disperze hypromelosy má významně nižší tuhost, je patrné, že koncentrace gelující složky má na hodnoty G* gelu vliv. Vliv na tuhost má též přídavek antibiotik. Hodnota G* hypromelosové disperze s antibiotiky je téměř 2,5× nižší. Nejméně tuhý materiál je 10 % gel rybí želatiny, u kterého hodnoty G* ~ 0,14 Pa. Velmi nízké hodnoty komplexního modulu byly naměřeny též u polymerních disperzí karagenanu a 5 % disperze želatiny.



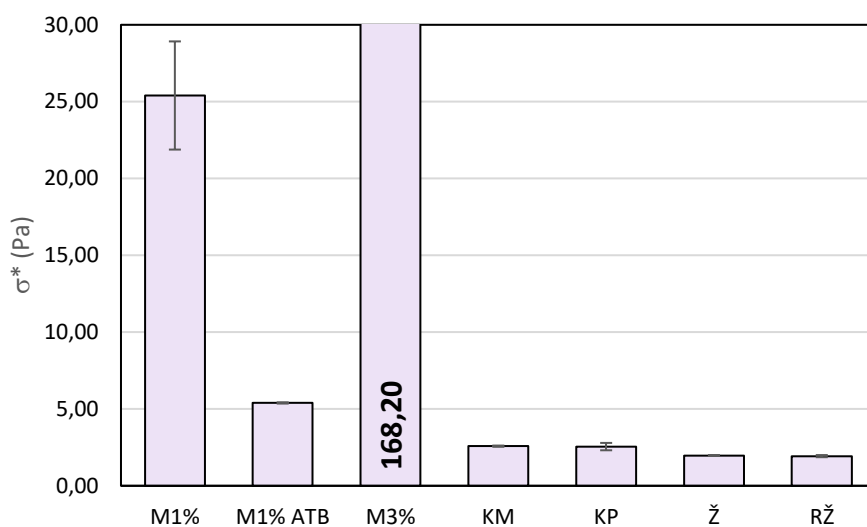
Obrázek 26: Porovnání komplexního modulu G^* polymerních disperzí

Mírou elasticity gelu, a tedy pružnosti struktury gelové struktury, je fázový úhel δ ($^\circ$). Hodnoty fázového úhlu všech připravených formulací jsou porovnány na Obr. 27. Jak již bylo zmíněno výše, hodnoty fázového úhlu nižší než 45° se objevují pouze u gelu 10 % rybí želatiny a 3 % gelu hypromelosy. 1 % disperze hypromelosy s i bez antibiotik, disperze iota karagenanu a 5 % disperze želatiny mají hodnoty fázového úhlu vyšší než 45° , jedná se tedy o soustavy s převažujícím viskózním chováním.



Obrázek 27: Porovnání fázového úhlu δ polymerních disperzí

Dalším parametrem, které byl získán v oscilačních testech, je mez toku σ' (Pa). Představuje hodnotu napětí, které musí být aplikováno na gel, aby došlo k destrukci jeho vnitřní struktury a začal téct. Vysoké hodnoty meze toku ~ 168 Pa byly naměřeny u hypromelosového gelu 3 % a dále u 1 % hypromelosové disperze (~ 25 Pa). 1 % disperze hypromelosy s antibiotiky, disperze iota karagenanu a disperze želatiny nevykazují mez toku (Obr. 28).

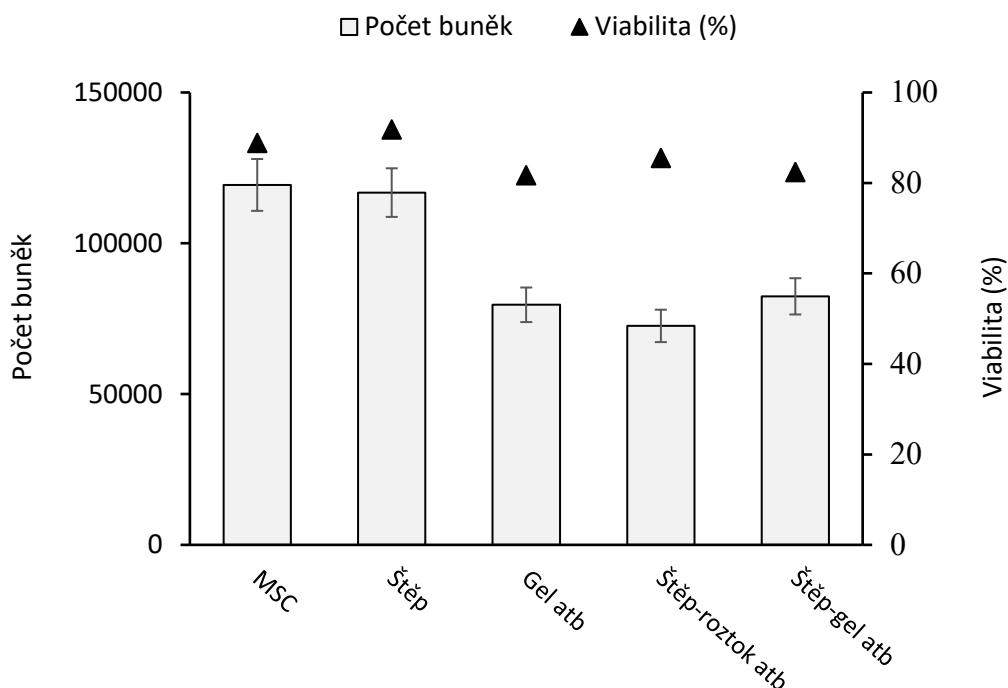


Obrázek 28: Porovnání meze toku σ' polymerních disperzí

8.3. Prolifrace a viabilita mezenchymálních kmenových buněk

Byla testována proliferace a životaschopnost mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v přítomnosti 3 % hypromelosového gelu s antibiotiky (Obr. 29). Proliferační aktivita v alogenní spongiózní kosti (štěpu) byla srovnatelná s kontrolní skupinou (MSC). Samotný kostní štěp měl stimulační účinek na proliferaci. Prolifrace byla dokonce vyšší než v kontrolních skupinách. Kostní štěp totiž funguje jako přirozené mikroprostředí pro mezenchymální buňky. Testovaný gel v porovnání s kontrolou snížil proliferaci a rovněž viabilitu. Z předchozích výsledků testování polymerních nosičů léčiv (Procházka et al., 2010)⁶⁵ je známo, že polymerní nosiče smíchané s kostními štěpy jsou pro mezenchymální kmenové buňky a následné regenerační procesy přijatelnější. Po počátečním poklesu proliferace obvykle následuje její zvýšení

za 7 – 10 dní. 3 % hypromelosový gel použitý jako nosič vankomycinu a gentamicinu nezpůsobil pokles viability buněk pod 80 %, přičemž 80 % je obecně považováno za práh pro významnou toxicitu.



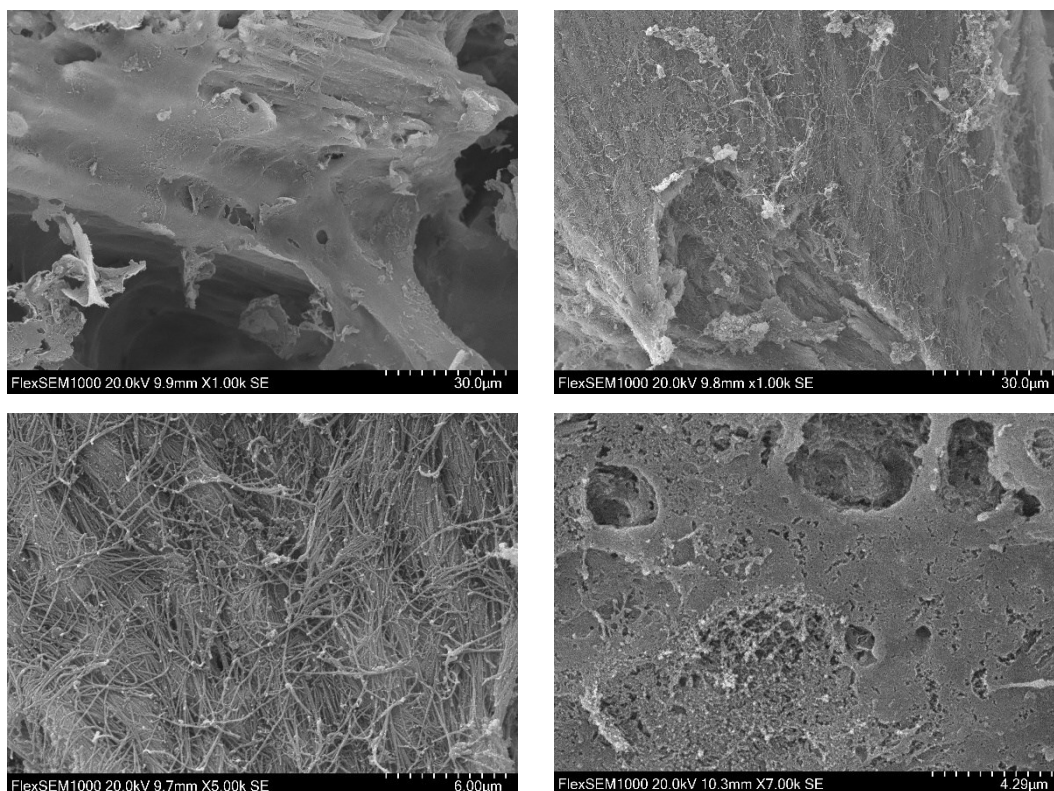
Obrázek 29: Proliferace a životaschopnost mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v přítomnosti roztoku a gelu antibiotik: MSC – kontrola; štěp – alogenní spongiózní kost v kultivačním médiu; gel atb – kultivační médium s 3 % hypromelosovým gelem s antibiotiky; štěp-roztok – alogenní spongiózní kost s roztokem antibiotik; štěp-gel atb – alogenní spongiózní kost s gelem antibiotik. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD ze čtyř měření.

8.4. Disoluce antibiotik

U vybraných polymerních formulací byly testovány jejich disoluční vlastnosti, tedy jejich schopnost uvolňovat účinnou látku. Konkrétně byla zadána antibiotika gentamicin-sulfát a vankomycin-hydrochlorid. Tato antiinfektiva se hojně využívají při ortopedických zákrocích, a to jak preventivně, tak při terapii již probíhající infekce. Antibiotika byla inkorporována do polymerních disperzí hypromelosy o koncentraci

1 % a 3 % a do gelu rybí želatiny o koncentraci 10 %. Následně byly v těchto disperzích impregnovány kostní štěpy.

Ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou Univerzity Hradec Králové byla provedena skenovací elektronová mikroskopie struktury kostních štěpů. Ze SEM snímků je viditelné, že je jejich struktura značně členitá a pórovitá, což je důležitá charakteristika pro účinnou impregnaci antibiotiky (Obr. 30).



Obrázek 30: SEM snímky kostních štěpů. Snímky byly pořízeny na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové Mgr. Janem Loskotem, Ph.D.

Vzhledem k postupu impregnace nemohou být gely příliš viskózní. Potenciálně by mohlo být pro efektivnější impregnaci využito *in situ* gelujících polymerů. Kostní štěpy by se impregnovaly v polymerním roztoku a gelová struktura by se vytvořila až v místě aplikace.

Karagenan jako surovina pro přípravu disperze s antibiotiky pro testování disoluce využita nebyla. Důvodem byla inkompatibilita na podkladu iontových interakcí mezi gentamicinem a karagenanem. Gentamicin-sulfát, který byl použitý při přípravě disperze, je kationaktivní léčivo. Může proto interagovat s látkami anionické povahy,

jako je karagenan. Z tohoto důvodu došlo ve vzorku při přípravě ke koagulaci a vzorek byl vyřazen z experimentu.

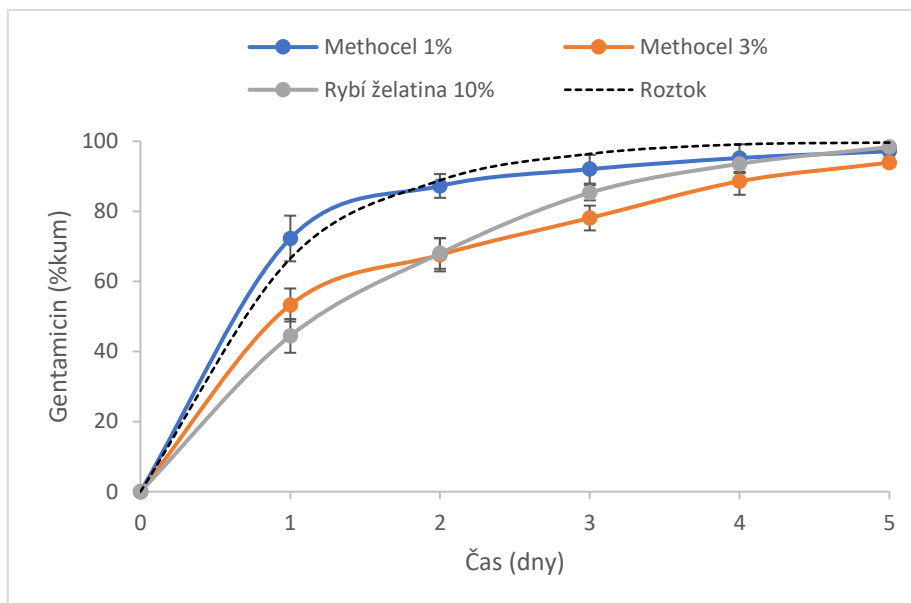
8.4.1. Disoluce gentamicinu

Množství uvolněného gentamicin-sulfátu je uvedeno v Tab. 18. Lze vidět, že gentamicin-sulfát se uvolňoval z kostních štěpů impregnovaných 1 % disperzí hypromelosy téměř stejně rychle, jako z kostních štěpů, které byly impregnovány v roztoku antibiotik. K uvolnění celkového množství antibiotika z 1 % disperze hypromelosy došlo již během 24 hodin. Nedošlo ani k ovlivnění počátečního burst efektu (Obr. 31).

Z formulací tvořených kostními štěpy impregnovanými 3 % hypromelosou a 10 % rybí želatinou se gentamicin-sulfát uvolňoval pomaleji. Došlo k omezení nežádoucího burst efektu, a to především u 10 % gelu rybí želatiny. Z gelu rybí želatiny se první den uvolnilo 44 % gentamicin-sulfátu, z 3 % gelu methocelu se uvolnilo 53 % antibiotika. U obou formulací se celkové množství antibiotika uvolnilo až 3. den. Je tedy viditelné žádoucí prodloužení uvolňování antibiotika o 2 dny.

Tabulka 18: Množství gentamicin-sulfátu (% kum.) uvolněného z kostních štěpů, které byly impregnovány příslušným gelem nebo roztokem

Čas (dny)	Methocel 1%	Methocel 3%	Rybí želatina	Roztok
1	72,26 ± 6,51	53,28 ± 4,71	44,45 ± 4,81	66,51 ± 4,59
2	87,25 ± 3,39	67,58 ± 4,71	68,00 ± 4,39	88,85 ± 4,63
3	92,03 ± 4,11	78,10 ± 3,53	85,30 ± 2,17	96,41 ± 6,52
4	95,22 ± 3,91	88,57 ± 3,85	93,57 ± 2,66	99,09 ± 7,29
5	97,14 ± 2,83	93,91 ± 1,27	98,34 ± 0,48	99,63 ± 7,65



Obrázek 31: Množství gentamicin-sulfátu uvolněné z kostních štěpů v závislosti na čase

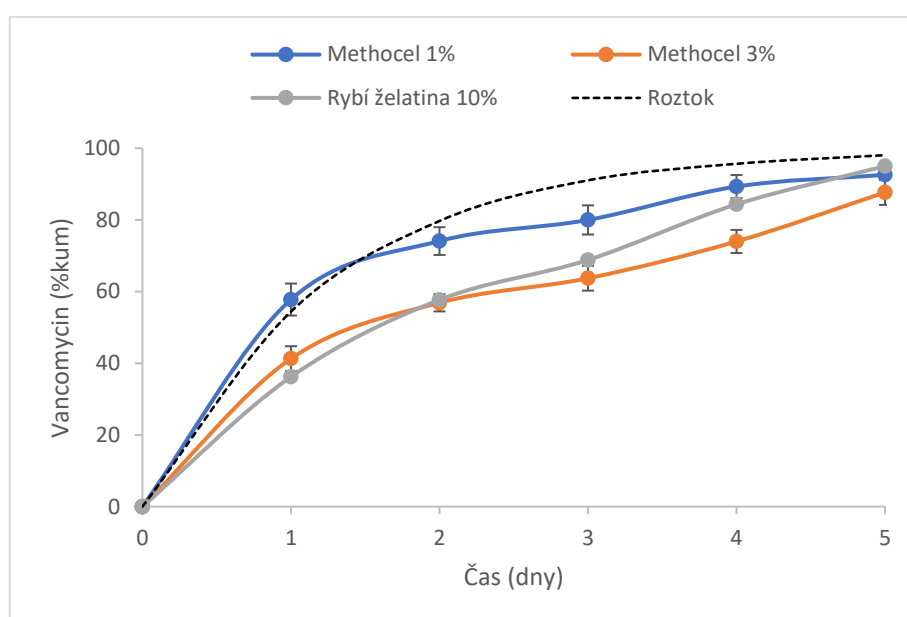
8.4.2. Disoluce vankomycinu

Množství uvolněného vankomycin-hydrochloridu je uvedeno v Tab. 19. V průběhu uvolňování vankomycin-hydrochloridu z kostních štěpů impregnovaných gelem došlo k dalšímu prodloužení (Obr. 32). I v případě 1 % hypromelosity došlo k mírnému prodloužení liberace, oproti roztoku se veškeré množství vankomycinu uvolnilo až 3. den. Uvolněná iniciální dávka je obdobná jako v případě uvolňování antibiotika z kostních štěpů impregnovaných v roztoku. Snížení burst efektu se projevilo u 3 % hypromelosity a 10 % rybí želatiny. Tam došlo první den k uvolnění 41 %, respektive 36 % celkového množství antibiotika. Veškeré množství vankomycinu se z disperze rybí želatiny uvolnilo 4. den. U gelu 3 % hypromelosity došlo k prodloužení liberace léčiva až na 5 dní.

Obecně lze konstatovat, že vankomycin-hydrochlorid se z testovaných formulací uvolňoval pomaleji než gentamicin-sulfát. Důvodem by mohla být jeho větší molekula, která se lépe uchytil v polymerní síti.

Tabulka 19: Množství vankomycin-hydrochloridu (kum. %) uvolněného z kostních štěpů impregnovaných příslušným gelem nebo roztokem

Čas (dny)	Methocel 1%	Methocel 3%	Rybí želatina	Roztok
1	57,78 ± 4,46	41,29 ± 3,47	36,22 ± 3,31	54,41 ± 4,59
2	74,11 ± 3,87	56,88 ± 2,41	57,70 ± 3,74	79,69 ± 4,63
3	79,99 ± 4,07	63,72 ± 3,45	68,83 ± 3,68	91,04 ± 6,52
4	89,3 ± 3,23	73,99 ± 3,23	84,35 ± 1,60	95,66 ± 7,29
5	92,58 ± 0,52	87,67 ± 3,47	95,01 ± 1,57	98,06 ± 7,65



Obrázek 32: Množství vankomycin-hydrochloridu uvolněné z kostních štěpů v závislosti na čase

9. ZÁVĚRY

Byly formulovány polymerní disperze hypromelosity, karagenanu a želatiny. Analýzou tokových křivek se prokázal neneutonský typ toku. U všech testovaných formulací dochází k poklesu viskozity s rostoucím mechanickým namáháním. Nejcitlivější na aplikované namáhání je hypromelosový gel 3 %, nejméně disperze iota-karagenanu s povidonem 25.

Oscilačními testy bylo zjištěno, že z testovaných formulací pouze 3 % disperze hypromelosity a 10 % disperze rybí želatiny mají vnitřní 3D strukturu odpovídající gelům. Ostatní formulace představují viskoelastické kapaliny. Pouze 1 % a 3 % disperze hypromelosity vykazují mez toku.

V disolučních testech gentamicin-sulfátu a vankomycin-hydrochloridu *ex vivo* po impregnaci kostních štěpů 3 % gelem hypromelosity došlo v porovnání s roztokem k prodloužení uvolňování gentamicin-sulfátu na 3 dny, v případě vankomycin-hydrochloridu na 5 dní. Proliferace mezenchymálních kmenových buněk v přítomnosti 3 % hypromelosového gelu s antibiotiky nebyla významně ovlivněna. Viabilita neklesla pod 80 %.

Lze konstatovat, že 3D gelová struktura je podmínkou pro modifikaci liberace antibiotik. Jako další potenciální depotní formulace s antibiotiky pro léčbu a prevenci muskuloskeletálních infekcí budou formulovány emulze v/o, tuhé disperze založené na PLGA či mikročásticové a nanočásticové systémy.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

-
- ¹ ROZSYPAL, H.: Základy infekčního lékařství. 1. vydání, 2015. Praha: Nakladatelství Karolinum, 572 s., ISBN 978-80-246-2932-2. *Infekce měkkých tkání*. s. 299-300.
- ² HABEYCH, M. E., TRINH, T., CRUM-CIANFLONE, N. F., Purulent infectious myositis (formerly tropical pyomyositis). *Journal of the Neurological Sciences*, 2020, p. 413, ISSN 0022-510X.
- ³ BARITEAU, J. T., et al.: Fungal Osteomyelitis and Septic Arthritis, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2014, 22 (6), p. 390-401, ISSN 1067-151X.
- ⁴ Dostupné z: <http://www.ortopedie-traumatologie.cz/Akutni-zanet-kosti-%28akutni-osteomyelitis%29>, datum náhledu: 23. 11. 2021.
- ⁵ Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/tendinitis#causes>, datum náhledu: 25. 11. 2021.
- ⁶ Dostupné z: <https://euc.cz/clanky-a-novinky/clanky/zanet-slach-priznaky-priciny-a-lecba/>, datum náhledu: 23. 11. 2021.
- ⁷ BENEŠ, Jiří, et al. *Infekční lékařství*. 1. vydání, 2009. Praha: Nakladatelství Galén, 651 s., ISBN: 978-80-7262-644-1, *Hnisavá artritida*, s. 505.
- ⁸ Dostupné z: <https://www.webmd.com/arthritis/septic-arthritis-symptoms-diagnosis-and-treatment#1>, datum náhledu: 22. 11. 2021.
- ⁹ SHARFF, K. A., RICHARDS E. P., TOWNES J. M.: Clinical Management of Septic Arthritis, *Current Rheumatology reports*, 2013, 15, ISSN 15346307.
- ¹⁰ DIEFENBECK M., MÜCKLEY M., HOFMANN G. O.: Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics, *Injury, International Journal of the Care of the Injured*, 2006, 37, ISSN 0020-1383.
- ¹¹ SHIRWAIKER R. A. et al.: A clinical perspective on musculoskeletal infection treatment strategies and challenges. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2015, 23, p. 44-54, ISSN 1067-151X.
- ¹² NANDI, S. K., et al.: Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis—A review. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, 29, p. 2478-2485, ISSN 0928-4931.

-
- ¹³ HANSSEN A. D.: Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 2005, 437, p. 91-96, ISSN 0009-921X
- ¹⁴ KLUIN, O. S., et al.: Biodegradable vs non-biodegradable antibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013, 10, p. 341-351, ISSN 1744-7593.
- ¹⁵ MAGNAN, B., et al: Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskeletal Surgery*, 2013, 97, p. 93-100, ISSN: 2035-5114.
- ¹⁶ GOLLWITZER H., IBRAHIM K., MEYER H. et al.: Antibacterial poly (D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biogradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51, p. 585–591, ISSN 1460-2091.
- ¹⁷ WACHOL-DREWEK, Z., PFEIFFER, M., SCHOLL E.: Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials*, 1996, 17, p. 1733-1738, ISSN 0142-9612.
- ¹⁸ HUMPHREY, J. S., MEHTA, S., SEABER, A. V., et al.: Pharmacokinetics of a degradable drug delivery system in bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 1998, 349, p. 218–224, ISSN 0009-921X.
- ¹⁹ GARVIN, K. L., et al.: Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1994, 76, p. 1500-1506, ISSN 1535-1386.
- ²⁰ KORKUSUZ, F. E. Z. A., et al.: Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *The Journal of bone and Joint Surgery*, 1993, 75, p. 111-114, ISSN 1535-1386.
- ²¹ THAMARAISELVI, T., RAJESWARI, S.: Biological evaluation of bioceramic materials-a review. *Carbon*, 2004, 18, p. 9-17, ISSN 0008-6223.
- ²² ANAGNOSTAKOS, K., SCHRÖDER, K.: Antibiotic-impregnated bone grafts in orthopaedic and trauma surgery: a systematic review of the literature. *International Journal of Biomaterials*, 2012, 2012, ISSN 16878787.
- ²³ KIM, H. W., KNOWLES, J. C., KIM, H. E.: Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(epsilon-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *Journal of Biomedical Materials Research*, 70, p. 240–249, ISSN 1552-4981.

-
- ²⁴ BENOIT, M. A., et al.: Antibiotic loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-coglycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *International Orthopaedics*, 1997, 21, p. 403–408, ISSN 1432-5195.
- ²⁵ GOLLWITZER, H., et al.: Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51, p. 585–591, ISSN 1460-2091.
- ²⁶ Dostupné z: <https://www.beznoska.cz/product/cervikokapitalni-nahrada-kycelniho-kloubu-typ-poldi/>, datum náhledu: 16. 12. 2021.
- ²⁷ EDIN, M. L. et al.: Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 333, p. 245–251, ISSN 0009-921X.
- ²⁸ CHALUPOVÁ Z., MASTEIKOVÁ R., SAVICKAS A., *Farmaceutické hydrofilní gely*, Česká a slovenská farmacie, 2, 2005, s. 55-59, ISSN 1805-4439.
- ²⁹ UN NABI, S. A. A. et al.: Pharmaceutical gels: a review. *RADS Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2016, 4, p. 40-48, ISSN 1482-1836.
- ³⁰ MARTINA, M., HUTMACHER, D. W.: Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review. *Polymer International*, 2007, 56, p. 145-157, ISSN 1097-0126.
- ³¹ HOARE, T. R., KOHANE, D. S.: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, 49, p. 1993-2007, ISSN 0032-3861.
- ³² LIN, Ch., METTERS, A. T.: Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58, p. 1379-1408, ISSN 1872-8294.
- ³³ GHASEMIYEH, P., MOHAMMADI-SAMANI, S.: Hydrogels as drug delivery systems; pros and cons. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2019, 5.1, p. 7-24, ISSN 5652-2423.
- ³⁴ GULATI, N., GUPTA, H.: Parenteral drug delivery: a review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2011, 5, p. 133–145, ISSN 2212-4039.
- ³⁵ BAE, K. H., WANG, L., KURISAWA, M.: Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 2013, 1, p. 5371-5388, ISSN 1364-5501.

-
- ³⁶ HAO, J., et al.: Fabrication of an ionic-sensitive in situ gel loaded with resveratrol nanosuspensions intended for direct nose-to-brain delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 147, p. 376-386, ISSN 0927-7765.
- ³⁷ KUMBHAR, A. B.; RAKDE, A. K.; CHAUDHARI, P. D.: In situ gel forming injectable drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2013, 4, p. 597-609, ISSN 0975-8232.
- ³⁸ SPIZZIRRI U., G., CIRILLO G.: *Functional hydrogels in drug delivery Key Features and Future Perspectives*, University of Calabria, Italy, p. 363, ISBN: 13:978-1-4987-4901-5, Stimuli-Responsive Hydrogels for Parenteral Drug Delivery, p. 234-258.
- ³⁹ CONG, H., et al.: Thermoresponsive gelation behavior of poly(N-isopropylacrylamide)-block-poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(N-isopropylacrylamide) triblock copolymers. *European Polymer Journal*, 61, 2014, p. 23-32, ISSN 0014-3057.
- ⁴⁰ OTTENBRITE, R. M., PARK K., OKANO T.: *Biomedical applications of hydrogels handbook*. 2010. New York: Springer Science & Business Media, p. 432, ISBN 978-1-4419-5919-5.
- ⁴¹ CHO, K. Y. et al.: Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, 260, p. 83-91, ISSN 2590-1567.
- ⁴² KULKARNI, R. V., BISWANATH, S. A.: Electrically responsive smart hydrogels in drug delivery: a review. *Journal of applied biomaterials and biomechanics*, 2007, 5, p. 125-139, ISSN 1722-6899.
- ⁴³ MIRONI-HARPAZ, I., et al.: Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8, p. 1838-1848, ISSN 1742-7061.
- ⁴⁴ FREDENBERG, S., et al.: The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 415, p. 34-52, ISSN 2590-1567.
- ⁴⁵ ALVAREZ-LORENZO, C., CONCHEIRO, A.: Effects of surfactants on gel behavior. *American Journal of Drug Delivery*, 2003, 1, p. 77-101, ISSN 2321-547X.
- ⁴⁶ LI, S., et al.: Antibacterial hydrogels. *Advanced Science*, 2018, 5, ISSN 2198-384.

-
- ⁴⁷ HAŠEK J.: Nové léčivé látky v magistraliter receptuře XVIII–gentamicin-sulfát, *Praktické lékárenství*, 2012, 3, s. 130-133, ISSN 1803-5329.
- ⁴⁸ Gentamicin Lek 80MG/2ML SOL 10X2ML, Souhrn údajů o přípravku, dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0096414&tab=texts>, datum náhledu 6. 1. 2022.
- ⁴⁹ TER BOO, G. J., et al.: Local application of a gentamicin-loaded thermo-responsive hydrogel allows for fracture healing upon clearance of a high *Staphylococcus aureus* load in a rabbit model. *European Cells & Materials*, 2018, 35, p. 151-164, ISSN 1473-2262.
- ⁵⁰ Vancomycin Mylan 500 MG INF PLV SOL 20, Souhrn údajů o přípravku, dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0263131&tab=texts>, datum náhledu: 6. 1. 2022.
- ⁵¹ Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDALAEK.htm, datum náhledu: 6. 1. 2022.
- ⁵² Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00798>, datum náhledu: 22. 4. 2022.
- ⁵³ Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00512>, datum náhledu: 22. 4. 2022.
- ⁵⁴ YANG, K., et al.: Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *International Journal of Nanomedicine*, 2018, 13, p. 2217-2263, ISSN 1178-2013.
- ⁵⁵ CHALABALA, M. et al.: *Technologie léků. 3. vyd.*, 2006, Praha: Nakladatelství Galén, s. 399, ISBN 80-7262-423-7, Systémy kapalných a tuhých látek, s. 10-15.
- ⁵⁶ GOH, E. G., WAN NIK, W. B.: A Generalized Model for Viscosity as a Function of Shear Rate. *ARP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2018, 13, p. 3219-3223, ISSN 1819-6608.
- ⁵⁷ *A Basic Introduction to Rheology*. Malvern Instruments Limited. 2016, 1-20. www.malvern.com.
- ⁵⁸ *Analyse_0004 - Power law model fit for viscometry*. www.malvern.com.
- ⁵⁹ HOLUBOVÁ R.: *Základy reologie a reometrie kapalin*. 1. vyd., Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2014, s. 23-27. ISBN: 978-80-244-4178-8.
- ⁶⁰ Dostupné z: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/contract-testing/glossary/linear-viscoelastic-region-lver/>, datum náhledu: 5. 1. 2022.

-
- ⁶¹ *Determination of the yield stress of complex fluids by oscillation testing*, Malvern Instruments Limited, 2014, 1-5. www.malvern.com.
- ⁶² ŠIŠKA B. et al.: Contribution to the rheological testing of pharmaceutical semisolids. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2019, 24, p. 80-88, ISSN 1097-9867.
- ⁶³ *Characterizing gel properties using oscillation testing on a rotational rheometer*. Malvern Instruments Limited. 2014, 1-5. www.malvern.com.
- ⁶⁴ *Evaluating product texture using oscillatory testing on a rotational rheometer*. Malvern Instruments Limited. 2014, 1-5. www.malvern.com.
- ⁶⁵ PROCHAZKA, E. et al.: Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human stem cell proliferation in S/G2 phase. *International orthopaedics*, 2010, 34(1), p. 137–142, ISSN 1432-5195.
- ⁶⁶ KUČERA, T. et al.: Elution kinetics of vancomycin and gentamicin from carriers and their effects on mesenchymal stem cell proliferation: an in vitro study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18, 381, 2017, ISSN 1471-2474.
- ⁶⁷ HOQUE, J. et al. Dual function injectable hydrogel for controlled release of antibiotic and local antibacterial therapy. *Biomacromolecules*, 2018, 19, p. 267-278, ISSN 1526-4602.