

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu

muskuloskeletálních infekcí I

Formulation of PLGA nanoparticles with vancomycin for local treatment of

musculoskeletal infections I

Diplomová práce

Hradec Králové 2023

Ivana Petrášová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Použitá literatura a zdroje pro zpracování jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury. Chtěla bych tímto poděkovat především PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, přátelský přístup a čas věnovaný konzultacím. Poděkování za spolupráci patří také Mgr. Vladislavu Frolovi, postgraduálnímu studentovi, Karolíně Ptáčkové, diplomantce katedry Farmaceutické technologie a Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. z katedry fyziky Přírodovědecké fakulty UHK. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která byla pro mě oporou po celou dobu studia.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
ZADÁNÍ.....	7
ÚVOD	8
SEZNAM ZKRATEK.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 Muskuloskeletální infekce.....	10
1.1.1 Léčba muskuloskeletálních infekcí	11
1.2 Terapeutické systémy pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí	14
1.2.1 Kostní štěpy.....	15
1.2.2 Keramika	15
1.2.3 Částicové systémy	16
1.3 Metody přípravy PLGA nanočástic.....	21
1.3.1 Odpařování rozpouštědla.....	21
1.3.2 Nanoprecipitace.....	22
1.3.3 Emulzně difúzní metody	23
1.3.4 Vysolování	24
1.3.5 Dialýza	25
1.4 Hodnocení nanočástic.....	25
1.4.1 Stanovení velikosti	26
1.4.2 Stanovení povrchového náboje	27
1.4.3 Stanovení struktury	27
1.4.4 Stabilizace a hodnocení stability	28
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
2.1 Materiály.....	30

2.2	Pomůcky	30
2.3	Přístroje.....	30
2.4	Postup přípravy nanočástic suspenzně-emulzní metodou	31
2.5	Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu	31
2.6	Kalibrační přímky.....	32
2.7	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	34
2.7.1	Nepřímá metoda	34
2.7.2	Přímá metoda.....	34
2.8	DSC	35
2.9	SEM.....	36
2.10	Disoluce vankomycinu.....	37
3	VÝSLEDKY	38
3.1	Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic	38
3.2	Enkapsulační účinnost	41
3.3	DSC	42
3.4	SEM.....	43
3.5	Liberace vankomycinu z nanočástic.....	44
4	DISKUZE.....	46
4.1	Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic	47
4.2	Enkapsulační účinnost	50
4.3	DSC	51
4.4	SEM.....	52
4.5	Liberace vankomycinu z nanočástic.....	53
5	ZÁVĚR.....	55
6	LITERATURA.....	56

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Ivana Petrášová

Název práce: Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí I

Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Pro léčbu muskuloskeletálních infekcí je vyžadována přítomnost vysoké koncentrace antibiotik v místě infekce. Vysoké dávky perorálně podávaných léčiv však způsobují riziko zvýšené systémové toxicity a závažných nežádoucích účinků. Cílená doprava léčiv, v současnosti jedna z hlavních oblastí farmaceutického výzkumu, představuje vhodnou alternativu léčby bez nadbytečného zatížení organismu.

Tato diplomová práce se zaměřuje na přípravu terapeutického systému pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí ve formě polymerních nanočástic obsahujících antibiotikum vankomycin. Z důvodu inkorporace hydrofilní antimikrobiální látky do nanočástic byla pro jejich přípravu použita suspenzně-emulzní metoda. K přípravě nanočástic byly použity různé koncentrace stabilizátoru polyvinylalkoholu a hydrofobního polymeru poly(D,L-laktid-*ko*-glycolid) větveného na tripentaerythritolu. V rámci výzkumu byla sledována velikost nanočástic, polydisperzita, zeta potenciál, enkapsulační účinnost stanovená přímou i nepřímou metodou, disoluční profil antibiotika, diferenciální skenovací kalorimetrie a skenovací elektronová mikroskopie. Podařilo se připravit stabilní nanočástice bez vznikajících aglomerátů v rozmezí velikostí přibližně 330 až 740 nm. Problémem však byla špatná enkapsulační účinnost, která umožnila zachytit nejvýše 50,9 % léčiva. Byl prokázán sférický tvar nanočástic pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Průběh liberace vykazoval na začátku vysoký burst-efekt. Následně doba liberace probíhala do 3. dne, kdy se uvolnilo přibližně 80 % léčiva.

Klíčová slova: Vankomycin, PLGA, nanočástice, velikost nanočástic, polydisperzita, uvolňování léčiva.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Ivana Petrášová

Title of thesis: Formulation of PLGA nanoparticles with vancomycin for local treatment of musculoskeletal infections I

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The treatment of musculoskeletal infections requires the presence of high antibiotics concentration at the infection site. However, high doses of orally administered drugs cause the risk of increased systemic toxicity and serious adverse effects. Targeted drug delivery, currently one of the main areas of pharmaceutical research, represents a suitable option of a treatment without excessive burden on the organism.

This diploma thesis focuses on the formulation of a therapeutic system for the local treatment of musculoskeletal infections in the form of polymer nanoparticles containing the antibiotic vancomycin. Due to the need of incorporation of a hydrophilic antimicrobial substance into them, the suspension-emulsion method of their preparation was used. Different concentrations of polyvinyl alcohol stabilizer and tripentaerythritol branched hydrophobic polymer poly(D,L-lactide-co-glycolide) were used for the preparation. Within the study the size of nanoparticles, polydispersity, zeta potential, encapsulation efficiency determined by direct and indirect methods, and dissolution profile of the antibiotic, differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy, were monitored. Preparation of nanoparticles without forming agglomerates in a size range from approximately 330 to 740 nm was achieved. However, the problem was the poor encapsulation efficiency enabling to capture no more than 50.9 % of the drug. The spherical shape of the nanoparticles was shown by scanning electron microscopy. The course of the liberation showed a high burst-effect at the beginning. Subsequently, the release period continued until day 3, when approximately 80 % of the drug was released.

Key words: Vancomycin, PLGA, nanoparticles size, polydispersity, drug release.

ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce byla příprava PLGA nanočástic s vankomycinem, jejich charakterizace, stanovení enkapsulační účinnosti a studium liberace vankomycinu.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Příprava nanočástic enkapsulovaných vankomycinem za použití větveného polyesteru kyseliny mléčné a glykolové.
2. Charakterizace nanočástic (velikost, zeta potenciál, polydisperzita, DSC, SEM).
3. Stanovení enkapsulační účinnosti.
4. Disoluce vankomycinu z nanočástic.

ÚVOD

Nespecifické a zavádějící příznaky muskuloskeletálních infekcí (MI) jsou častou příčinou pozdě stanovené diagnózy. Postihuje tak mnoho lidí, kteří na následky destrukce kostí nebo kloubů trpí chronickou bolestí a celkovým zhoršením kvality života. Léčba chronické bolesti systémovými antibiotiky je omezena z důvodu jejich dostupnosti do místa infekce. Proto bývá doplněna chirurgickým zákrokem pro lokální podávání antimikrobiálních látek na speciálních nosičích. Lokální léčba zamezuje především vysoké zátěži organismu plynoucí ze systémově podávaných antibiotik a snižuje šanci na rozvoj bakteriální rezistence. Pro inkorporaci antibiotik je možno použít celou řadu nosičů, zejména polymerních, a formulovat aplikační formy, např. nanočástice. Takové terapeutické systémy mohou zajistit řízené uvolňování antibiotik a snížit toxicitu léčiva. Uvolňování léčiv z polymerních nanočástic zajišťuje větší předvídatelnost včetně požadované kinetiky uvolňování účinné látky. V závislosti na vlastnostech inkorporovaného antibiotika je možné využít několik způsobů přípravy polymerních nanočástic včetně metody suspenzně-emulzní, což je předmětem této diplomové práce. Experiment navazuje na diplomové práce Hamplové [1], Bieleszové [2] a Holase [3]. Zároveň souvisí s diplomovou prací Ptáčkové [4], ve které jsou studovány polymerní nanočástice s vankomycinem připravované dvojitě-emulzní metodou.

SEZNAM ZKRATEK

AIBG	antibiotiky impregnovaný kostní štěp
ALBC	kostní cement s antibiotiky
ATB	antibiotika
CL	kaprolakton
DCM	dichlormethan
DLS	dynamický rozptyl světla
DMAB	didodecyldimethylamoniumbromid
EE	encapsulation efficiency (enkapsulační účinnost)
HAP	hydroxyapatit
LC	loading capacity (množství léčiva v nanočásticích; kapacita polymeru pro léčivo)
MI	muskuloskeletální infekce
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NČ	nanočástice
PBS	phosphate buffered saline – fosfátový pufr
PC	fosfatidylcholin
PCL	poly(ϵ -kapronolakton)
PDI	polydispersity index (index polydisperzity)
PDLLA	kyselina poly-DL-mléčná
PEG	polyethylenglykol
PLA	poly(D,L-laktid) (kyselina polymléčná)
PLGA	poly(D,L-laktid- <i>co</i> -glycolid)
PM	polymerní micely
PMMA	polymethylmethakrylát
P-TCP	P-trikalciumfosfát
PVA	poly(vinylalkohol)
SLN	pevné lipidové nanočástice
T	tripentaerythritol
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
T _g	teplota skelného přechodu (°C)
VAN	vankomycin
ZP	zeta potenciál

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Muskuloskeletální infekce

Muskuloskeletální infekce je napadení svalů, kostí nebo kloubů bakteriemi. Stanovení diagnózy je velmi náročné, a proto doba od nástupu atypických a často zavádějících příznaků do určení diagnózy trvá přibližně rok [5, 6]. Tím, že je diagnóza opožděná, dochází k destrukci kostí nebo kloubů, trvalé invaliditě a špatné kvalitě života. Většinou se jedná o chronickou mono– nebo oligoartritidu [6]. Mezi muskuloskeletální infekce můžeme zařadit tenosynovitidu, septickou artritidu, osteomyelitidu, spondylitidu a další.

Tenosynovitida je velmi bolestivý kloubní problém způsobený jak fyzickou aktivitou, tak revmatoidní artritidou, diabetem, dnou, sklerodermií, kapavkou nebo infekcí. Poškozením funkce synoviálního obalu nedochází k tvorbě synoviální tekutiny, která zvlhčuje šlachy [7, 8].

Vznik **septické artritidy** neboli zánětu kloubního prostoru, může být způsoben nejen traumatem či chirurgickým zákrokem, ale vliv může mít také imunosuprese při terapii autoimunitních onemocnění [9]. Bakteriální replikace a následný zánětlivý proces v kloubu mohou vést k jeho rychlé lokální destrukci, která mnohdy bývá spojená se systémovou infekcí [10]. K nejčastějším patogenům se řadí *Staphylococcus aureus*, podílející se na vzniku infekční artritidy, nebo *Streptococcus pyogenes*, který je spojovaný především s autoimunitními poruchami, chronickými kožními infekcemi a traumaty. Nemoc postihuje především děti a starší osoby, přičemž muži bývají postiženi častěji než ženy [11].

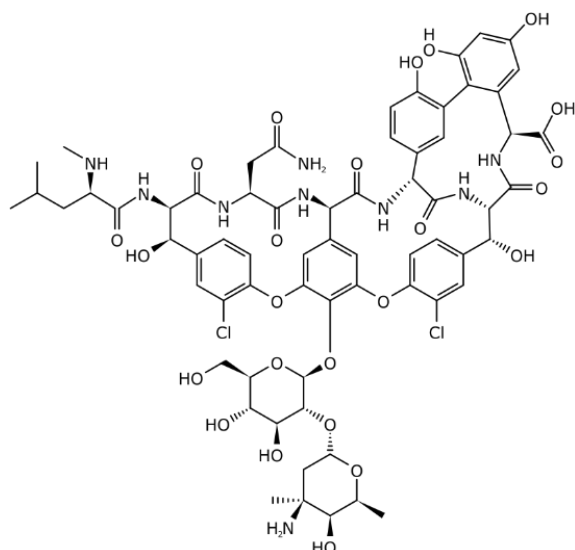
Osteomyelitida je zánětlivé infekční onemocnění kosti, které vede k nekróze a kostní destrukci [12]. Vlivem různých faktorů dochází během infekce ke ztrátě kosti [13]. Zánět bývá nejčastěji vyvolán bakterií *Staphylococcus aureus* přímou (otevřená zlomenina, operace), nebo krevní cestou z jiného ložiska v těle [14].

Spondylitida je infekční onemocnění obratlového těla, meziobratlové ploténky nebo paraspinálních tkání. Na základě mikrobiální etiologie se dělí na pyogenní spondylitidu, která vzniká hematogenním šířením bakterií a představuje neurologický a život ohrožující stav, tuberkulózní a plísňovou spondylitidu [15]. Nejčastějším místem infekce je bederní páteř, přičemž distribuce etiologických mikroorganismů se liší podle oblasti obratle [15, 16]. Nejčastěji jde o druh *Staphylococcus aureus*, vyskytující se ve všech oblastech páteře [15]. Ačkoli důvod není znám, postižení se týká dvakrát častěji mužů než žen [16].

1.1.1 Léčba muskuloskeletálních infekcí

Léčba muskuloskeletálních infekcí spočívá v systémové léčbě antibiotiky anebo v lokálním podávání léků. Typ antimikrobiálních léčiv se určuje podle výsledků odebraných vzorků z kultivačních médií. V případě nemožné izolace původce patogenů z místa infekce je využita empirická terapie, která pokrývá různé mikroorganismy. Perorální antimikrobiální látky jsou účinné při eradikaci akutních infekcí za předpokladu jejich vysoké biologické dostupnosti, velmi dobrého průniku do kosti a dlouhého poločasu eliminace. Uvolněním proteolytických enzymů a toxických volných radikálů způsobujících zánět a případnou destrukci okolních tkání však dochází k omezenému průtoku krve do oblasti infekce a později přechází do chronické formy. Špatná vaskularizace oblasti může navíc vést k tvorbě sekvestra, který vzniká důsledkem kostní destrukce a představuje tak překážku pro průnik antimikrobiálních látek. Proto je použití systémových antibiotik u chronické léčby velmi omezené. Jejich použití u chronických infekcí je také nevýhodné i z hlediska dlouhodobé léčby, kdy se zvyšuje šance na rozvoj bakteriální rezistence a výskyt vedlejších účinků. Léčebný cyklus chronických infekcí začíná intravenózním podáním antimikrobiálních látek po dobu 2 až 6 týdnů. Poté se přechází na perorální léčbu antibakteriálními látkami, která může trvat až 6 měsíců [17]. K jedním z často používaných antibiotik u léčby muskuloskeletálních infekcí je vankomycin a gentamicin.

Vankomycin



Registrační číslo CAS: 1404-90-6

Molární hmotnost: 1449,3 g/mol

Vazba na bílkoviny: 30–55 % [18]

Sumární vzorec: C₆₆H₇₅Cl₂N₉O₂₄

Teplota tání: 190 °C [19]

Obr. 1: Strukturální vzorec gentamicinu [20].

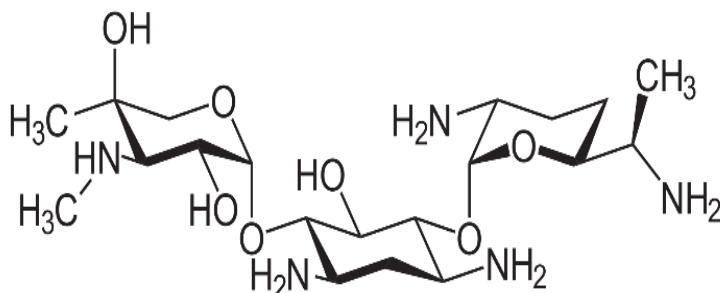
Vankomycin (Obr. 1) je glykopeptidové antibiotikum účinné proti většině grampozitivních patogenů vyskytujících se u muskuloskeletálních infekcí, včetně methicilin-

rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) [20]. Byl objeven v roce 1952 E. C. Kornfieltem a byl indikován k léčbě zvláště závažných infekcí (meticilin-rezistentního *S. aureus*). Po více než 30 letech úspěšné aplikace a léčby však došlo k nadměrnému užívání a tím spojeného nárůstu výskytu rezistence u některých enterokoků (*Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis*). V současné době je používán pouze u závažných, život ohrožujících infekcí, u kterých léčba jinými, méně toxickými antibiotiky selhala [21].

Z chemického hlediska se jedná o heptapeptid s navázanou cukernou složkou. Mechanismus účinku vankomycinu spočívá v inhibici tvorby buněčné stěny bakterií. Navázáním na koncový D-alanyl-D-alanin muramylpentapeptidu brání prodlužování řetězce peptidoglykanu a blokuje zesílení příčných vazeb, které jsou nezbytné pro správnou syntézu buněčné stěny [22, 23]. Bylo prokázáno, že plocha pod koncentrační křivkou (AUC) dělená MIC (AUC/MIC) je nejlepším prediktorem baktericidní aktivity vankomycinu proti *Staphylococcus aureus* citlivým na meticilin. Jako optimální poměr se považuje $AUC/MIC \geq 400$ za 24 hodin [24].

Vankomycin je hydrofilní léčivo ($\log P -3,1$) [25]. Vzhledem k jeho hydrofilní povaze lze očekávat téměř úplné vyloučení močí, kdy 80–90 % léku zůstává v nezměněné podobě. V závislosti na zdravotním stavu a věku pacienta je biologický poločas zpravidla 6 až 12 hodin, přičemž při insuficienci ledvin může být prodloužen až na 7 dní [26]. Úzký terapeutický index vankomycinu vykazuje nutnost terapeutického monitorování plazmatické koncentrace tohoto léčiva a pravidelnou kontrolu funkčního stavu ledvin. K nejvýznamnějším nežádoucím účinkům vankomycinu se řadí nefrotoxicita a ototoxicita [22, 25]. Vankomycin zvyšuje účinek depolarizujících i nedepolarizujících periferních myorelaxancií a warfarinu [22]. Biologická dostupnost po perorálním podání je dosti omezená, a proto je za hlavní cestu podání považována intravenózní infuze [25]. Velmi dobře tak proniká do tkání a sekretů, ale koncentrace vankomycinu v centrálním nervovém systému jsou velmi nízké [22].

Gentamicin



Registrační číslo CAS: 1403-66-3

Molární hmotnost: 477,596 g/mol

Vazba na bílkoviny: 0–30 % [27]

Sumární vzorec: $C_{21}H_{43}N_5O_7$

Teplota tání: 105 °C [28]

Obr. 2: Strukturální vzorec gentamicinu [29].

Gentamicin (Obr. 2) byl objeven a izolován v roce 1963 z *Micromonospora purpurea* [29]. Jedná se o aminoglykosidové baktericidní antibiotikum se širokým spektrem účinku. Je indikován k léčbě několika infekcí a zánětů, včetně infekcí kostí a kloubů, které jsou způsobeny gramnegativními, nebo některými grampozitivními bakteriemi [22]. Zvláště užitečný je pro léčbu těžkých gramnegativních infekcí včetně infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa* [27].

Z chemického hlediska se jedná o trisacharidy obsahující atypické aminocukry. Mechanismus účinku aminoglykosidů spočívá v inhibici proteosyntézy vazbou na 30S podjednotku bakteriálních ribosomů. Antimikrobiální účinek gentamicinu je závislý na koncentraci. Aminoglykosidy zároveň vykazují i postantibiotický účinek neboli zpomalení růstu bakterií i při poklesu plazmatické koncentrace pod MIC [30]. Za výhodné se považuje jeho synergické působení s betalaktamovými antibiotiky, neboť může přispět nejen pro léčbu komplexních infekcí, ale i k optimalizaci dávky a snížení nežádoucích účinků.

Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky patří nefrotoxicita a ototoxicita. Příznaky nefrotoxicity zahrnují zvýšení plazmatického kreatininu a močoviny, zatímco příznaky ototoxicity zahrnují problémy s rovnováhou, nevolnost, tinnitus a ztrátu sluchu [27]. Riziko obou toxicit významně koreluje s délkou léčby, nikoli s vysokými koncentracemi [30]. Pacient je z důvodu nepředvídatelnosti ototoxicity sledován, neboť zmíněný nežádoucí účinek zůstává často jako trvalý následek léčby [27]. Doba léčby gentamicinem by proto neměla přesáhnout 5 dní, a to i z důvodu malého distribučního objemu léčiva [30].

Gentamicin je polární, hydrofilní léčivo, s úzkým terapeutickým indexem [22]. Úvodní doporučená dávka je $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, po které by mělo následovat terapeutické monitorování léčiva pro optimalizaci dávkovacího intervalu [31]. V organismu nedochází k jeho biotransformaci a vylučuje se tedy v nezměněné formě ledvinami [22]. Eliminační poločas léčiva u zdravých jedinců je 2 až 3 hodiny a zvyšuje se s klesající funkcí ledvin [30]. Gentamicin zvyšuje účinek depolarizujících i nedepolarizujících periferních myorelaxancií a může snižovat až antagonistovat účinek inhibitorů acetylcholinesterázy. Aplikuje se nitrosvalově, případně nitrožilní infuzí. Dobře proniká do tkání a sekretů, ale terapeutických hodnot v CNS dosahuje pouze při meningitidě [22].

Lokální aplikace antimikrobiálních látek využívá speciálních nosičů, umožňujících jejich proniknutí do kostních tkání a zvýšení koncentrace v místě infekce, přičemž se vyhýbají systémovým vedlejším účinkům a toxicitě. V současné době je mnoho dostupných systémů

určených k léčbě muskuloskeletálních infekcí. Mohou být nedegradabilní nebo degradabilní a některé mohou také poskytovat mechanickou oporu dlouhým kostem během procesu hojení [17]. V následující kapitole jsou uvedeny příklady takových systémů.

1.2 Terapeutické systémy pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí

Za zlatý standard lokální léčby v ortopedické chirurgii je považován kostní cement s antibiotiky (ALBC). Antibiotika (ATB) jsou uvolňována z různých akrylátových kostních cementů, jako jsou např. Simplex-P nebo Palacos [32]. Rychlost uvolňování závisí na porositě, homogenitě a viskozitě cementu, poměru povrchu k objemu, a hlavně na celkovém množství přítomných antibiotik. ATB vhodné k impregnaci cementu musí být termálně i chemicky stabilní, dostupné v práškové formě, baktericidní a širokospektré [33]. Podle velikosti dávky a typu antibiotika přítomného v kompositu se odvíjí jejich indikace. Nízká dávka je především určena k profylaktické terapii, kdežto vysoké dávky, kde poměr je alespoň 3,6 g antibiotika na 40 g akrylového cementu, jsou žádoucí pro účinnou kinetiku eluce a dosažení ustálených terapeutických hladin. K léčbě protetických kloubních infekcí se využívají různě tvarované ALBC vložky. Základním předpokladem pro použití takových distančních vložek je nejen dodávání antibiotik, ale také zachování délky a tvaru efektivního kloubního prostoru. Distanční vložky ve tvaru kuliček jsou využívány především při léčbě osteomyelitidy k vyplnění prázdného prostoru, kdy aplikace obvykle nevyžaduje použití specifických tvarů nebo strukturálních požadavků [32]. Nejrozšířenějším biologicky neodbouratelným materiálem jsou kuličky z polymethylmethakrylátu PMMA. Zajišťují kontrolovanou supresi infekce a významný pokles výskytu rekurentních infekcí [17]. Největší nevýhodou nebiodegradovatelných systémů je nutnost sekundárních chirurgických zákroků k odstranění cizího materiálu, ke kterému obvykle dochází po 4 týdnech, jakmile ustane eluce antibiotika [32, 34]. Výhodná není ani jejich příprava, kdy produkované teplo během procesu polymerace ovlivňuje stabilitu většiny antimikrobiálních látek [17]. Z PMMA kuliček je uvolněno pouze 25 % antibakteriální látky, zatímco v biodegradabilním systému může být většina eluována [35]. Navíc bakterie jsou schopny adherovat, nebo dokonce kolonizovat cement naplněný antibiotiky, což může zapříčinit prodlouženou dobu implantace a možnost opakujících se nebo přetrvávajících infekcí [36]. Kuličky při léčbě infikované endoprotézy kyčle nebo kolena jsou používány jen zřídka, neboť po 4 až 6 týdnech se kuličky obklopí silnou jizvou. Schopnost identifikovat a odstranit kuličky tak může být extrémně obtížné [32].

Výhodou biodegradabilních systémů je jejich postupné odbourávání na metabolizovatelné degradační produkty, kdy postupným nahrazováním systému vzniká nová kostní tkáň [32, 37]. Tím dochází k obnovení normálních kostních funkcí [37]. K často používaným biologicky rozložitelným materiálům v mnoha systémech pro lokální dodání léčiv, se řadí kostní štěp, keramika a částicové systémy [17].

1.2.1 Kostní štěpy

Antibiotiky impregnovaný kostní štěp (AIBG) využívaný při léčbě kostí a kloubů může být autologní (kost od dárce je transportována na jiné místo u stejného dárce) nebo alogenní (kost od dárce je transportována do jiného příjemce). Implantuje se do oblasti kostního defektu a může být impregnován různými antibiotiky v závislosti na profilu citlivosti původce infekce. Impregnace antibiotiky probíhá nejčastěji buď manuálním mísením kostního štěpu s antibiotikem ve formě prášku, nebo impregnační roztokem antibiotik. Antibiotikum se adsorbuje na povrchy kostí a poskytuje tak vysoké a účinné koncentrace k eradikaci infekce [17, 36]. Koncentrace uvolněných antibiotik z kostních štěpů dokonce převyšují koncentrace antibiotik uvolněných z jiných lokálních nosičů. Současně však vyšší koncentrace antibiotik může být spojena s toxickým účinkem na buňky, jako je snížená schopnost replikace osteoblastů nebo dokonce buněčná smrt [36]. Ideální kostní štěp by měl vykazovat osteoindukci, osteokondukce a osteogenezi [13].

1.2.2 Keramika

Ačkoli keramické nosiče léčiv mají omezené použití z důvodu křehkosti, mohou být užitečné zejména při fixaci nebo náhradě tvrdých pojivových tkání včetně kostí [37]. K náhradě a zvětšení kostní tkáně se využívá keramika ze solí fosforečnanu vápenatého, jako jsou především hydroxyapatit (HAP), který představuje hlavní složku anorganické fáze kosti, nebo P-trikalciumfosfát (P-TCP) [38]. Povlak z hydroxyapatitu je navíc vhodný k zajištění fixace ortopedického kovového implantátu [37]. Jedná se tedy o nejrozšířenější biokeramiku na bázi fosforečnanu vápenatého. Aby materiály fosforečnanu vápenatého byly bioaktivní (tvořily přímé chemické vazby s kostí nebo s měkkou tkání) a navázaly se na živou kost, je nutné na jejich povrchu vytvořit nerozpustnou kostní vrstvu apatitu. Tato vrstva vzniká z iontů přítomných v tělních tekutinách. Následnými interakcemi na povrchu materiálu dojde k resorpci apatitu a tvorbě kosti [38]. Měkká tkáň nebo kostní defekt se tak může pomalu plnit tkání bez potřeby rekonstrukce [39]. Na rozdíl od kostních minerálních krystalů mají

biomateriály fosforečnanu vápenatého malý povrch a silné krystalické vazby. Na základě biologických parametrů a složení samotných krystalů, včetně sil vyvinutých vazeb, se bioresorbovatelnost fosforečnanu vápenatého odlišná [38]. U materiálů sintrovaných při ultra vysokých teplotách, pomáhajících především zvýšit jejich pevnost, mohou přítomná léčiva ztratit svou biologickou aktivitu. Hydroxyapatit je tak současně neresorbovatelný, nebo jen velmi pomalu vstřebatelný. Naproti tomu materiály sintrované při nižší teplotě (900 °C) jsou resorbovatelné [38, 40]. Pokud je tento materiál impregnován antibiotiky, může být účinnou alternativou k polymethylmethakrylátu a intravenózně podávaným antibiotikům [39]. Závěrem lze tedy říci, že keramika s fosforečnanem vápenatým vykazuje netoxicitu pro tkáň, bioresorpci a osteoinduktivní vlastnosti [38].

1.2.3 Částicové systémy

V porovnání s implantáty nabízejí injektovatelné částicové systémy snadnější způsob aplikace do postižené oblasti. Částicové systémy jsou ve formě nanočástic a mikročástic [17]. Nanočástice, jako doručovací systémy pro antibiotika o velikosti stovek nanometrů, jsou významným technologickým a lékařským průlomem [41]. Využitím polymerních materiálů se léčivo stabilizuje na povrchu částic.

Polymerní nanočástice

Postupnou degradací polymeru je zajištěno řízené a prodloužené uvolňování antibiotika, založené na kinetice prvního řádu [42]. Polymerní nosiče musí být biologicky odbouratelné, netoxické a neimunogenní včetně jejich degradačních produktů. Dále by polymerní nanočástice měly vykazovat vhodné vlastnosti pro cílové dodávání léčiv. Proto existuje pouze omezený počet polymerů splňujících tyto požadavky [43]. Polymery lze rozdělit na přírodní (produkty na bázi proteinů) a syntetické [32]. Mezi používané přírodní polymery patří chitosan, želatina, alginát sodný, albumin nebo kolagen [44, 45]. Syntetické polymery si svou oblibu získaly díky rychlosti degradace, předvídatelnosti, mechanickým vlastnostem, či zlepšené kinetice uvolňování léčiva. V závislosti na molární hmotnosti polymeru umožňují profily řízeného uvolňování v řádu týdnů až měsíců [32, 45]. K syntetickým polymerům je navíc možné přidat další látky, jako jsou např. růstové faktory, které se podílejí na procesu regenerace kostí [32]. Mezi často používané syntetické polymery se řadí např. [45]:

Polyethylenglykol (PEG), který je výhodný především z důvodu dobré hydrofility, flexibility, odolnosti vůči imunologickému rozpoznání, biokompatibility a nevytváření kombinací s proteiny.

Kyselina polymléčná (PLA), která ve vodném prostředí hydrolyzuje a následně se metabolizuje na vodu a oxid uhličitý, byla z hlediska vhodné biologické rozložitelnosti a dobré bezpečnosti schválena Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro použití v tkáňovém inženýrství, lékařských materiálech a nosičích léků [46].

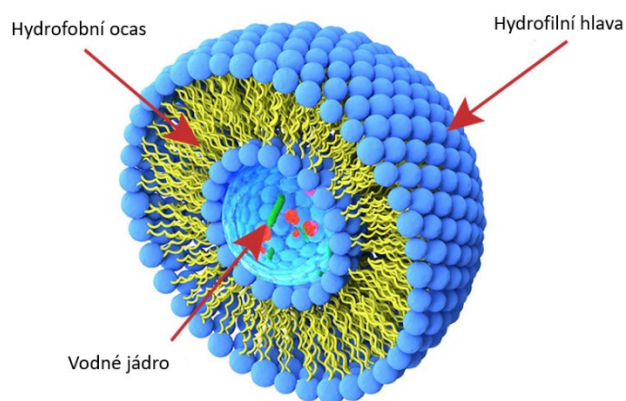
Poly(kaprolakton) (PCL) je semikrystalický, hydrofobní polymer s relativně polární esterovou skupinou. Syntetizuje se většinou z monomerů kaprolaktonu (CL) metodou polymerace. Vzhledem k vysokému stupni krystalinity a hydrofobní povaze vykazuje poměrně pomalou degradaci [47].

Polyester PLGA je kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, kdy syntéza probíhá náhodnou kopolymerací těchto dvou monomerů. Během procesu polymerace dochází k postupnému spojení pomocí esterových vazeb a vzniku PLGA [48]. Rychlost degradace polymeru PLGA je kromě molekulové hmotnosti rovněž ovlivněna poměrem laktidu a glykolidu [45]. Kyselina glykolová je oproti mléčné hydrofilnější, a proto mají polymery s vyšším obsahem glykolidu kratší dobu rozkladu s výjimkou případu poměru glykolové a mléčné kyseliny 50:50, u kterého se uvádí, že má nejrychlejší degradaci [48, 49]. Naopak polymery s vyšším obsahem kyseliny mléčné jsou hydrofobnější, absorbují méně vody a rozkládají se pozvolnějším způsobem, čehož lze využít pro řízené a trvalé uvolňování léčiva v rozmezí týdnů až měsíců [48]. V případě, že vlivem hydrolyzy esterových vazeb a následného vzniku původních monomerů (kyseliny mléčné a glykolové) dojde ke snížení místního pH, může nastat problém. V důsledku kyselého prostředí může totiž vzniknout zánětlivá reakce, snížit se účinek podávaných antibiotik, a také se urychlit proces hydrolytické eroze polymeru, čímž se ovlivní uvolňování léčiv [45]. Rychlost biodegradace, či bobtnání nebo mechanická pevnost polymeru bývá ovlivněna také fyzikálními vlastnostmi (index polydisperzity, teplota skelného přechodu (T_g) a stupeň krystalinity) [48]. PGA v závislosti na M_w je vysoce krystalická molekula s vysokým bodem tání (225–230 °C) a nízkou rozpustností v organických rozpouštědlech. PLA je naopak chirální molekula a ve své racemické směsi je amorfní, konkrétně v kyselině poly-DL-mléčné (PDLLA). Zde platí, že čím více bude L-enantiomeru, tím vyšší bude stupeň krystalinity. Terminály řetězce PLGA mohou být ponechány jako karboxylová skupina, která se využívá při esterifikačních reakcích ke spojení s jinými

sloučeninami (malé, makromolekuly nebo polymery), nebo mohou být zakončena esterifikací (s alkyl nebo methylestery), čímž jsou stabilnější a mají nižší rychlost degradace [49].

Lipozomy

Lipozomy jsou malé sférické vezikuly sestávající z lipidové dvojvrstvy tvořené přírodními, nebo syntetickými lipidy a vnitřním kompartmentem s léčivem (Obr. 3). Nejčastěji používaným lipidem je fosfatidylcholin (PC), přičemž začleněním cholesterolu do přípravku se membrána stabilizuje [41]. Struktura lipozomu umožňuje začlenění jak hydrofilních, tak hydrofobních léčiv. Hydrofilní léčiva mají tendenci být zachycena v jádru, zatímco hydrofobní jsou zachycována v lipidových dvojvrstvách [50]. Lipozomy také mohou zvýšit rozpustnost léčiv a podpořit fúzi s biologickými membránami, což vede k uvolnění a zachycení léčiv do cílového místa. Lipozomy snižují toxicitu léčiva, zvyšují jeho stabilitu a zajišťují prodloužené uvolňování a tím i účinek léčiva. Bylo vyvinuto několik systémů založených na liposomech pro různé aplikace, pro snížení toxicity antibiotik a uplatnily se též v technologii vakcín [41].



Obr. 3: Struktura lipozomu [50].

Pevné lipidové nanočástice (SLN)

SLN jsou složeny z pevné lipidové matrice naplněné léčivy a stabilizované povrchově aktivními látkami. Lipofilní část SLN v lipidové matrici poskytuje ochranu chemicky labilním lékům. Tento systém si získal pozornost především díky vynikající biologické dostupnosti dodávaných léčiv a vysoké biokompatibilitě [51]. Poskytují cílené dodávání léčiv s vynikající fyzikální stabilitou a dobrým profilem uvolňování [52]. Jejich malá velikost a velká plocha povrchu umožňuje pomocí ligandů, protilátek či funkčních skupin zacílit na specifická místa nebo buňky v těle [53]. Řízené uvolňování léčiva je dosaženo pevnými lipidy, ve kterých je mobilita léčiva podstatně nižší než u kapalných olejů [54]. SLN byly vyvinuty jako alternativa

koloidních systémů pro dodávání léčiv (emulze, lipozomy, nanoemulze, polymerní nanočástice a niozomy) k překonání problémů, jako je únik léků a náhlé uvolnění. SLN jsou ideálními nosiči pro lipofilní léky, protože jsou tvořeny pevnými lipidy. Naopak molekuly rozpustné ve vodě postrádají afinitu k lipidové matici, a proto mají silnou tendenci rozdělovat se do vnější vodné fáze během procesu přípravy. Vývoj SLN jako nosiče pro molekuly rozpustné ve vodě je proto stále těžce dosažitelným cílem [55]. Základní metodou pro výrobu SLN je vysokotlaká homogenizace [56]. Pro inkorporaci hydrofilních léčiv do SLN se běžně používají metody založené na dvojitě emulzi a mikroemulzi [55].

Nanoemulze

Nanoemulze jsou heterogenní systémy obsahující rozptýlené kapičky oleje stabilizované povrchově aktivními látkami ve vodném médiu [41]. Velikosti kapiček nanoemulze jsou typicky v rozmezí 20 až 200 nm a vykazují nízkou polydisperzitu [57]. Z termodynamického hlediska jsou jako běžné emulze v nerovnovážném stavu. Avšak kinetika destabilizace nanoemulzí je tak pomalá (řádově měsíce), neboť vliv jejich velmi malé velikosti brání flokulaci kapiček a koalescenci, že jsou považovány za kineticky stabilní [58]. Velký povrch kapiček spojený s jejich malou velikostí často vede k vysoké reaktivitě s biologickými buňkami a makromolekulami, čímž je dosaženo vyšší biologické dostupnosti než u konvenčních emulzí [59]. Procesy přípravy nanoemulzí se dělí na vysokoenergetické (zahrnují použití specifických zařízení, jako jsou vysokotlaké homogenizátory nebo sonifikátory) a nízkoenergetické metody (metoda spontánní emulgace a teplotní metoda fázové inverze) [60].

Micelární systémy

Polymerní micely (PM) vznikají samovolným sestavením amfifilních blokových kopolymerů ve vodném prostředí [61]. Blokové kopolymery jsou makromolekuly složené ze dvou nebo více chemicky odlišných polymerů spojených kovalentními vazbami. Monomerní jednotky těchto polymerů jsou sestaveny do bloků v lineárním uspořádání [62]. Struktura micel představuje částici s hydrofobním jádrem, odděleným od vnějšího vodního prostředí hydrofilními složkami tvořící plášť. Hydrofobní jádro těchto micel umožňuje zapouzdření několika málo terapeutických látek rozpustných ve vodě. Distribuce velikosti částic PM je typicky v rozsahu 10 až 100 nm [61]. V závislosti na hydrofobních a hydrofilních segmentech a typu rozpouštědla mohou vznikat micely různé morfologie (kuličky, tubuly nebo inverzní micely) [63]. Mezi další výhody lze zahrnout také vysokou stabilitu a schopnost kumulace v patologických oblastech s narušenou vaskulaturou. Úpravou povrchu micel

různými ligandy mohou specificky cílit na nemocné tkáně a buňky [64]. Micely se připravují různými metodami, jako je ředění, lyofilizace, odpaření rozpouštědla, dialýza a emulzními technikami typu olej ve vodě [63]. V posledních dvou desetiletích byly aktivně studovány především polymerní micely jako nový typ systému nosičů léčiv, zejména pro cílení protirakovinných léčiv na pevné nádory [65].

Nanosuspenze

Nanosuspenze jsou submikronové koloidní disperze nanočástic léčiva stabilizované povrchově aktivními látkami, polymery nebo směsmi obou látek [66, 67]. Umožňují tak podání vysokých dávek léčiva, vykazují nízký výskyt vedlejších účinků pomocných látek (především nosičů) a nevyžadují vysoké náklady [67]. Nanosuspenze mění také farmakokinetiku léčiva a tím zlepšují jeho bezpečnost a účinnost, což je výhodné pro molekuly se špatnou rozpustností, špatnou permeabilitou nebo obojím [66]. Vzhledem k submikronové velikosti nanočástic a odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem mají potenciální schopnost intravenózně dodávat léčiva špatně rozpustná ve vodě a lipidech bez jakékoli blokády krevních kapilár [66, 68]. V důsledku zvýšené rozpustnosti se zvyšuje rychlost uvolňování účinné látky a rychleji je dosaženo maximální hladiny v plazmě [66]. Díky značnému zvýšení biologické dostupnosti, adaptability pro povrchovou modifikaci a mukoadhezi pro cílení léčiva, významně rozšířily rozsah této nové formulační strategie [68]. Aplikační cesta nanosuspenzí může být orální, oční, topická, bukalní, nazální a transdermální [68]. Ke klíčovým faktorům pro úspěšnou výrobu se řadí resuspendovatelnost bez agregace a stabilizace v roztoku i v pevném stavu [68]. Přípravu nanosuspenzí lze uskutečnit použitím konvenčních zařízení pro redukci velikosti (mokrý mlýn, vysokotlaký homogenizátor) a formulačními přístupy (odpařování emulzního rozpouštědla, emulgace taveniny a superkritických kapalin, srážení, difuze rozpouštědla) [68, 69].

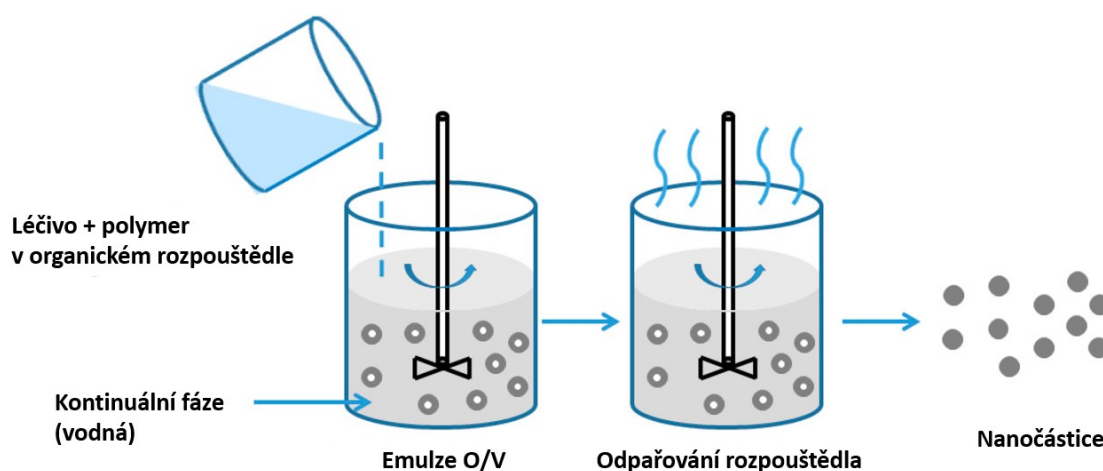
Nevýhodou nanosuspenzí je jejich fyzikální nestabilita v důsledku nukleace a růstu částic, kdy následně může dojít např. k agregaci nebo sedimentaci dispergovaných nanočástic během skladování. Z malých rozpuštěných částic se začnou tvořit větší, aby dosáhly termodynamicky stabilnější stav. Právě velký povrch nanočástic a vysoká povrchová energie vede k aglomeraci a růstu krystalů, známé jako Ostwaldovo zrání. Proto se do nanočástic přidávají vhodné stabilizátory nebo polymery, které se adsorbují na povrch nanosuspenzí léčiva [70]. Dalším řešením pro zlepšení stability, zejména při dlouhodobém skladování, je proces lyofilizace [71].

1.3 Metody přípravy PLGA nanočástic

Nanočástice PLGA lze syntetizovat buď technikou *bottom-up* nebo technikou *top-down*. První zmíněná technika znamená přípravu nanočástic polymerací jednotek monomerů. K této technice se řadí metody emulzní polymerace, mezifázová polymerace a srážecí polymerace. Technika *top-down* zahrnuje metodu odpařování rozpouštědla, nanoprecipitaci, emulzně-difuzní metodu, vysolování, nebo dialýzu, kdy nanočástice jsou syntetizovány z předem vytvořeného polymeru. Pro nepřetržitě úsilí o zlepšení velikosti nanočástic, snížení PDI, lepší zachycení aktivních látek (hydrofilní a hydrofobní) a snížení potenciální toxicity různých složek byly vyvinuty nové metody založené na mírných modifikacích standardních metod a aplikaci nových syntézních kroků při tvorbě nanočástic PLGA, jako je např. suchá metoda pro vodu v oleji [72]. Volba konkrétního způsobu zapouzdření je určována především úvahami o rozpustnosti léčiva a molekulární stabilitě [73].

1.3.1 Odpařování rozpouštědla

Metoda je založena na emulgaci organického roztoku polymeru ve vodné fázi s následným odpařením organického rozpouštědla (Obr. 4) [72].



Obr. 4: Příprava nanočástic metodou odpařování rozpouštědla [74].

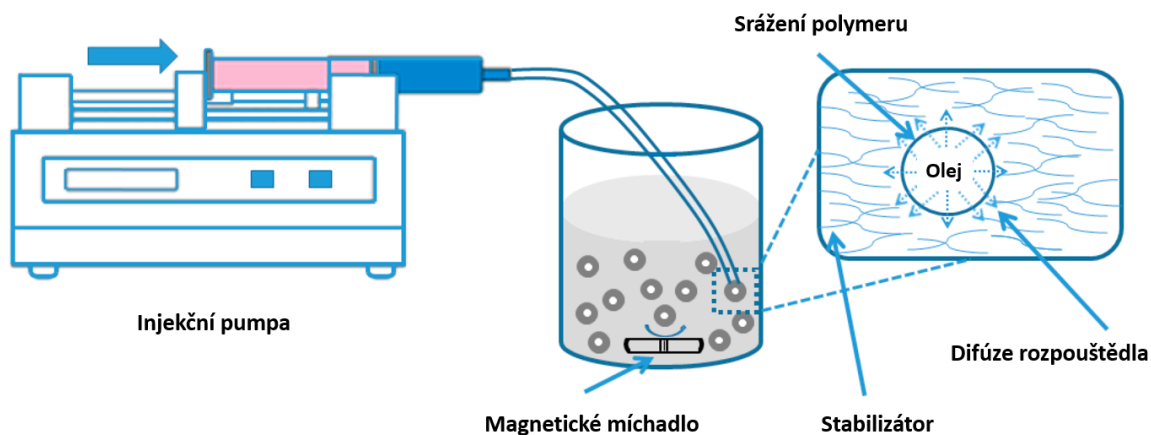
Polymer (PLGA) se rozpustí v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou (např. chloroform, ethylacetát) za vzniku roztoku, ve kterém se rozpustí nebo disperguje léčivo [75, 76]. Vzniklá organická fáze (O) je pomocí vysokorychlostní homogenizace nebo ultrazvuku emulgována do kontinuální vodné fáze (V) obsahující tenzid (např. polyvinylacetát; PVA), aby výsledná emulze O/V byla stabilní [75, 77]. Organické polární rozpouštědlo se v posledním kroku odpařuje z vodné fáze kontinuálním mícháním

na elektromagnetické míchače při pokojové teplotě, neboť může způsobit problémy související s toxicitou a ohrožit životní prostředí. Vlivem míchání a ubývání rozpouštědla se z polymeru formují nanočástice. Nakonec se nanočástice suspendované v kontinuální fázi promyjí a vysuší [75, 77]. Metoda je vhodná především pro léčiva lipofilní, neboť hydrofilní léčiva ve zvýšené míře unikají z vnitřní fáze do vnější vodné fáze a obsah léčiva v nanočásticích se tak snižuje [75].

Zapouzdření hydrofilních léčiv je dosaženo použitím dvojitých emulzí nebo inverzních miniemulzních systémů [78]. Metody dvojitého odpařování emulze-rozpouštědlo mají navíc vysokou účinnost enkapsulace jak hydrofilních, tak hydrofobních léčiv [79]. Dvojité emulze se připravují přidáním primární emulze V/O do vnější fáze za vzniku systému V/O/V nebo V/O/O. V případě V/O/V působí prostřední organická fáze jako bariéra proti úniku léčiva z vnitřní vodné fáze do vnější vodné fáze. Systém V/O/O využívá lipofilní látku jako vnější kontinuální fázi a hydrofilní léčivo pak nemá tendenci unikat do vnější kontinuální fáze [75]. Za účelem zvýšení stability emulzí jsou ve většině případů do formulace přidávány stabilizátory, které mohou rovněž ovlivnit nejen fyzikálně chemické vlastnosti vzniklých částic (velikost, hodnoty zeta potenciálu), ale i rychlost uvolňování léčiva, biodistribuci, mukoadhezi a buněčnou absorpci v závislosti na typu a koncentraci použitého stabilizátoru [80]. Další technikou pro zachycení hydrofilních léčiv je metoda dvojité emulze pevná látka v oleji ve vodě (S/O/V). Pro zachycení pevných částic je léčivo nejdříve rozpuštěno v organické fázi za vzniku disperze pevná látka-organická fáze (S/O). Následným přidáním do vodné fáze vzniká sekundární emulze (S/O/V). Snížená konformační mobilita pevných částic zachovává jejich biologickou aktivitu a vyšší stabilitu ve srovnání se strukturálními změnami u částic ve formě roztoku. Tato metoda umožňuje účinně zachytit citlivé materiály s menším poškozením [81].

1.3.2 Nanoprecipitace

Metoda je typicky používána pro zachycování hydrofobních léčiv díky mísitelnosti rozpouštědla s vodnou fází (Obr. 5) [72, 82]. Při této metodě se nevyžadují vysokosmykové homogenizační techniky ani ultracentrifugace [49].

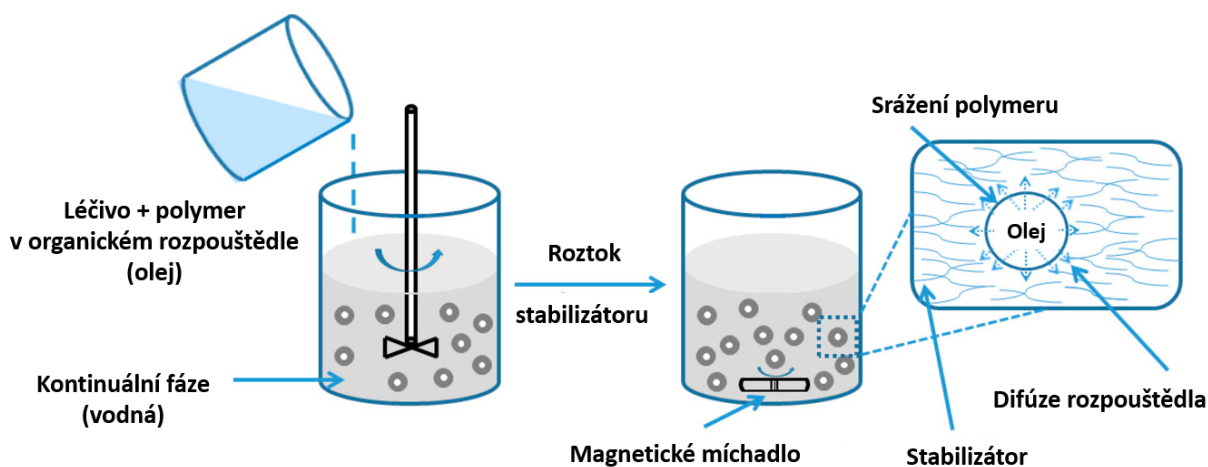


Obr. 5: Příprava nanočástic metodou nanoprecipitace [74].

Polymer se nejdříve rozpustí v polárním rozpouštědle mísitelném s vodou (aceton, acetonitril, ethanol, methanol), a poté se přidá a rozpustí léčivo. Tento organický roztok se vstříkuje (tj. přidává po kapkách) do vodné fáze během magnetického míchání. Tvorba nanočástic probíhá okamžitě rychlou difúzí rozpouštědla. Nakonec se rozpouštědlo a určitý podíl vody za sníženého tlaku odstraní a upraví na požadovaný objem suspenze [72, 83]. Do vodné fáze se můžou přidat stabilizátory (povrchově aktivní látky), ačkoli pro samotnou tvorbu nanočástic není tato podmínka nutná. Za velkou nevýhodu této metody je považována nízká účinnost enkapsulace hydrofilních sloučenin [49].

1.3.3 Emulzně difúzní metody

Tato metoda pro enkapsulaci léčiv z již předpřipraveného polymeru spočívá v rozpuštění polymeru v organické fázi částečně mísitelné s vodou (např. benzylalkohol, propylenkarbonát, ethylacetát) (Obr. 6).

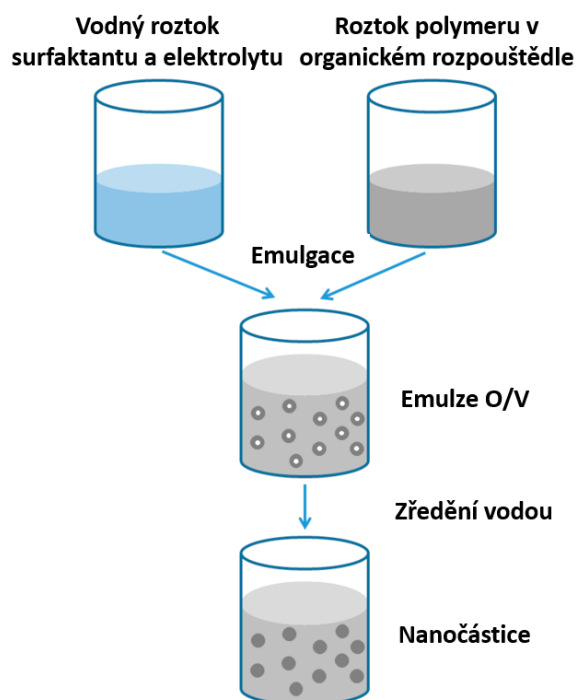


Obr. 6: Příprava nanočástic metodou emulzní difúze [74].

Organická fáze je za stálého míchání emulgována s vodným roztokem obsahujícím stabilizátor (povrchově aktivní látka, např. aniontový dodecylsulfát sodný (SDS), neiontový polyvinylalkohol (PVA) nebo kationtový didodecyldimethylamoniumbromid (DMAB)). Přidáním dostatečného množství vody dojde k difúzi organického rozpouštědla a vzniku polymerních nanočástic. Mezi parametry ovlivňující velikost nanočástic se řadí poměr kopolymeru PLGA, koncentrace polymeru, povaha rozpouštědla, molekulová hmotnost povrchově aktivního polymeru, viskozita, fázové poměry, rychlost míchání, povaha rozpouštědla, teplota a průtok přidané vody [72].

1.3.4 Vysolování

Tato metoda spočívá v rozpuštění léčiva a polymeru (PLGA) v polárním rozpouštědle mísitelném s vodou (aceton, tetrahydrofuran), představujícím organickou fází (Obr. 7) [44, 72].



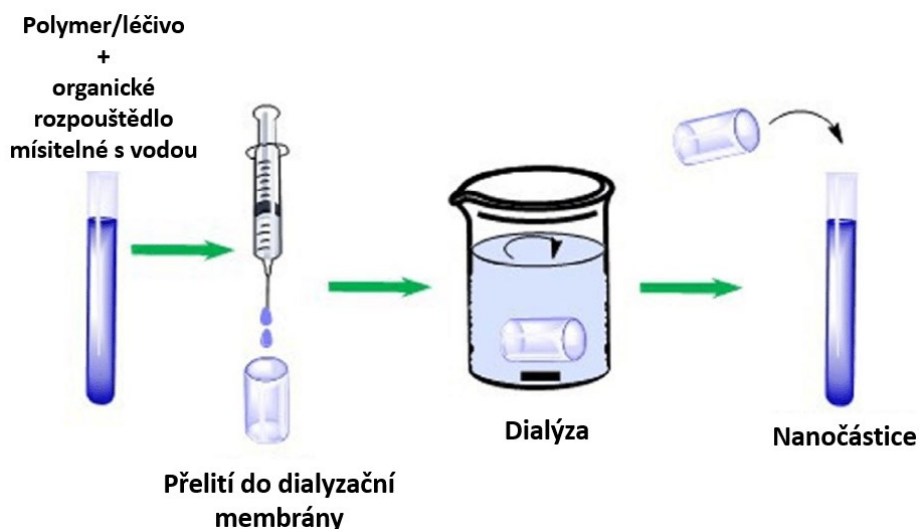
Obr. 7: Příprava nanočástic metodou vysolování [74].

Organická fáze je následně emulgována ve vodné fázi obsahující emulgátor (polyvinylpyrrolidon, hydroxyethylcelulóza) a vysolovací činidlo [72]. Vysolovacím činidlem jsou nejčastěji elektrolyty (např. chlorid sodný, octan hořečnatý, chlorid vápenatý), nebo neelektrolyty se silným vysolovacím potenciálem (např. sacharóza) [44, 72]. Kvůli přítomnosti vysokých koncentrací solí, nerozpustných v organické fázi, nedochází k difúzi rozpouštědla. Vzniklá emulze O/V je za mírného míchání zředěna dostatečným

objemem vody nebo vodného roztoku, čímž se sníží iontová síla a dojde k migraci organického rozpouštědla do vodné fáze s následným vznikem nanočástic. Konečným krokem je čištění pomocí filtrace s příčným tokem nebo centrifugace, aby se odstranilo vysolovací činidlo [72].

1.3.5 Dialýza

Dialýza je jednoduchá a účinná metoda pro přípravu malých nanočástic (lipozomy, polymerní micely). Postup výroby nanočástic je zobrazen na Obr. 8.



Obr. 8: Příprava nanočástic metodou dialýzy [84].

Polymer (PLGA) a léčivo se rozpustí v organickém rozpouštědle (např. dimethylformamid). Vzniklý roztok se přelije do dialyzační membrány a umístí do míchající se vnější vodné fáze. Následnou difúzí molekul rozpouštědla z membrány do vnější vodné fáze dojde k jejich vysrážení a tvorbě sférických nanočástic [85]. Mechanismus vzniku polymerních nanočástic dialyzační metodou není v současnosti zcela objasněn. Předpokládá se, že by mohl být založen na podobném mechanismu jako je u nanoprecipitace navržené *Fessi et al.* [44].

1.4 Hodnocení nanočástic

Fyzikálně-chemické vlastnosti připravených polymerních nanočástic různými metodami se mohou od sebe vzájemně lišit. Může se jednat například o složení, velikost, tvar nebo povrchové vlastnosti. Vzhledem k použitelnosti polymerních nanočástic je důležitá jejich charakterizace, zjistitelná různými technikami, která umožňuje posoudit jejich účinnost, zdravotní a bezpečnostní rizika [77].

1.4.1 Stanovení velikosti

Velikost hraje u nanočástic důležitou roli, neboť má vliv na průchod buněčnou membránou, reguluje cirkulaci v krevním řečišti a penetraci fyziologickými bariérami, a dokonce může ovlivnit imunitní odpověď. Tvar nanomateriálů má klíčovou roli v jejich biodistribuci, buněčné absorpci, cíleném dodávání léčiv a retenci v tkáních a orgánech. Tvar i velikost nanomateriálů lze současně určit metodami elektronové mikroskopie, do kterých se řadí skenovací elektronovou mikroskopie (SEM) a transmisní elektronovou mikroskopie (TEM).

SEM je metoda povrchového zobrazování, při které dopadající elektronový paprsek skenuje povrch vzorku. Interakcí mezi vzorkem a elektronovými paprsky dojde k emisi elektronů, které jsou zachyceny detektorem převádějícím signály na výsledný obraz [86]. Celkem se rozlišují čtyři skupiny emitovaných elektronů, z nichž nejběžnější je detekce elektronů sekundárních s rozlišovací schopností 5–15 nm [87].

TEM je metoda založena na průniku elektronového paprsku do krystalického vzorku. Elektrony vstupují nejdříve do kondenzorové čočky, která je soustředí do řízeného průměru a konvergence. Dopadající elektronový paprsek proniká vzorkem a elektrony s ním interagující jsou přeměněny na elektrony nerozptýlené, elasticky rozptýlené, nebo neelasticky rozptýlené [86, 87]. Paprsek po průchodu vzorkem je zachycen čočkou objektivu, která jej přenáší do čočky projektoru. Z objektivu projektoru je detekován detektorem, který poskytuje zobrazení [86]. TEM poskytuje přímé obrazy a chemické informace o nanomateriálech v prostorovém rozlišení až na úroveň atomárních rozměrů (<1 nm) [87].

Velikost koloidních disperzí lze charakterizovat pomocí techniky dynamického rozptylu světla (DLS). DLS využívá osvětlení suspenze částic nebo molekul podstupujících Brownův pohyb laserovým paprskem. Dochází k časově závislému kolísání intenzity rozptýleného světla, které se analyzuje pomocí vhodného detektoru [88]. Čím rychleji se částice pohybují, tím rychleji se intenzita rozptýleného světla mění, přičemž větší částice vykazují pomalejší Brownův pohyb než menší [89]. Následně je detekována funkce signálu. Měřením rychlosti Brownova pohybu je získán translační difúzní koeficient (D). Tento difúzní koeficient lze převést na hydrodynamický průměr (D_H) pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice [88]:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}, \quad (1)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je teplota a η je viskozita disperzantu. K výhodám této metody lze zahrnout rychlý a jednoduchý průběh měření (do 10 min) vyžadující jen velmi malé

množství vzorku. Kritický krok nastává u čištění a plnění měřících kyvet vzorkem, kde může dojít k narušení nebo překrytí signálu analytu z důvodu přítomného prachu nebo mikrobublinek. Filtrace všech používaných kapalin a důkladné čištění kyvet, pipet a stříkaček, je proto nezbytná [89].

Stupeň distribuce velikosti částic přítomných v dané suspenzi je stanovován indexem polydisperzity (PDI) [90]. Jedná se o bezrozměrné číslo nabývajících hodnot v rozmezí 0–1, přičemž za bezpečné, stabilní a účinné nanonosiče jsou považovány homogenní disperze určité velikosti s hodnotami blížícími se nule [91].

1.4.2 Stanovení povrchového náboje

K povrchovým vlastnostem nanočástic se řadí mj. jejich povrchový náboj, který ovlivňuje jejich penetraci fyziologickými bariérami, stabilitu disperzí, nebo agregaci či kumulaci nanomateriálů, a také má potenciální účinek vazby na receptor [87]. Obecně je povrchový náboj získán pomocí měření zeta potenciálu, které je založeno na principech rozptylu světla [87, 92]. Částice s povrchovým nábojem je obklopena Sternovou vrstvou, která je tvořena těsně spojenými ionty s opačným nábojem, než jaký je na povrchu částice. Za touto vrstvou se nachází difúzní vrstva, která má ionty volně seskupené. Asi ve středu této vrstvy se nachází hranice, známá jako kluzná rovina, oddělující ionty pohybující se spolu s částicí od iontů, které zůstávají na místě. Potenciál v této kluzné rovině je nazýván zeta potenciál [92]. Nanočástice s hodnotami zeta potenciálu mezi -10 a +10 mV jsou považovány za přibližně neutrální, zatímco hodnoty větší než +30 mV nebo menší než -30 mV vykazují silně aniontové nebo silně kationtové nanočástice [93]. Zeta potenciál závisí na řadě parametrů, včetně teploty, pH, vodivosti (iontová síla) a rozpouštědla (viskozita). Malé změny v kterémkoli z těchto parametrů mohou mít potenciálně dramatické účinky na hodnoty zeta potenciálu [92].

1.4.3 Stanovení struktury

Konečná struktura nanomateriálů závisí na použitých složkách, koncentracích reakčních složek, reakčních teplotách a podmínkách rozpouštědla použitých při jejich syntéze. Zvýšením teploty materiál získá dostatek energie a dochází k reorganizaci struktury. Změnu materiálových přechodů (např. tání, krystalizace, skelný přechod) lze měřit pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), kdy následná analýza DSC měření může určit strukturu a stabilitu zkoumaného materiálu [87]. DSC umožňuje detekci fázových přechodů (přeměna hmoty z jedné fáze do druhé) v širokém rozmezí teplot (-90 až 550 °C). Fázové přechody se klasifikují

jako termodynamické přechody 1. a 2. řádu. Pokud k fázovému přechodu nedochází, dodávaný tepelný tok je stejný, měří se nulový signál. U termodynamické přeměny 1. řádu nastává nespojitá (skoková) změna termodynamických vlastností systému (objem, entalpie, entropie). V takovém případě dojde ke změně tepelného toku, jelikož dochází k pohlcení (endotermní děj) nebo uvolnění (exotermní děj) latentního tepla během izotermických změn hmoty. U termodynamické přeměny 2. řádu se mění termodynamické vlastnosti spojitě (zlomově) a nespojitě se mění tepelná kapacita, izotermická stlačitelnost a koeficient tepelné roztažnosti. V polymerních systémech se jako přechod druhého řádu definuje teplota skelného přechodu (T_g) [94]. T_g je teplota, při které materiál v pevném skupenství mění svou konformaci v obou směrech mezi pryžovým a sklovitým stavem [94]. Tím, že je nižší než teplota tání (T_m), využívá se hlavně u materiálů vyžadujících příliš vysoké teploty, u kterých se stanovení T_m neprovádí [95].

Princip metody tedy spočívá ve změně rozdílu dodávaného tepelného toku do zkoumaného a referenčního vzorku ve stejném teplotním nastavení. Referenční vzorek se volí tak, aby v rozmezí teplot, kde předpokládáme fázový přechod ve vzorku zkoumaném, nevykazoval žádnou změnu. V momentě, kdy dochází k fázovému přechodu u zkoumaného vzorku, se mění i tepelný tok, aby se zajistila stejná teplota mezi zkoumaným vzorkem a referencí [96]. Exotermické děje (např. krystalizace, kondenzace, desublimace) se projeví nárůstem signálu (vyšší tepelný tok do reference), naopak endotermické děje (např. tání, var, sublimace) poklesem signálu (menší tepelný tok do reference).

1.4.4 Stabilizace a hodnocení stability

Farmaceutická stabilita nano léků se týká zachování stejných vlastností po určitou dobu poté, co je léčivo vyrobeno. Může být ovlivněna jedním nebo více faktory, jako je např. teplota, vlhkost, rozpouštědla, pH, enzymatická degradace, nebo přítomnost pomocných látek [87]. Ke stabilizaci koloidních systémů, včetně nanosuspenzí, se používají vhodné stabilizátory, které poskytují stérický nebo elektrostatický stabilizační účinek [70]. Elektrostatické odpuzování, citlivé na přidaný elektrolyt, nastane prostřednictvím iontových povrchově aktivních látek. Oproti tomu neiontové povrchově aktivní látky a polymery stabilizují prostřednictvím stérického odpuzování, které je citlivé na změny v rozpustnosti a molární hmotnosti vrstvy adsorbované polymerem [70, 97]. Mezi stabilizátory běžně používané ke stabilizaci nanosuspenzí patří polymery (např. polyvinylalkoholy, povidon, hypromelosa a hyprolosa, polyethylenglykoly). Obecně je stérická stabilizace polymerního typu vhodná

pro zajištění stability léčiva během zpracování, protože na rozdíl od běžných nízkomolekulárních povrchově aktivních látek obvykle nepoškozuje krystalovou strukturu částic léčiva [70].

Stabilita disperze je určována zeta potenciálem, kdy hodnoty vyšší jak 30 mV vykazují elektrostaticky stabilní disperze. Nízká hodnota zeta potenciálu (menší než 30 mV) indikuje stav směřující k flokulaci nebo aglomeraci. Tepelnou stabilitu lze naopak hodnotit několika tepelnými technikami, mezi které patří DSC [87].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiály

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Česká republika

Dichlormethan čistý, Penta, Česká republika

Ethylester kyseliny octové, Penta, Česká republika

Fosfátový pufr pH 7,4 tablety, Sigma-Aldrich, Česká republika

Chloroform, Penta, Česká republika

Poly(D,L-laktid-*ko*-glycolid) větvený na tripentaerythritolu, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Česká republika

Poly(vinylalkohol), Sigma-Aldrich, Česká republika

Vancomycin Kabi 500 mg, Fresenius Kabi, Česká republika

2.2 Pomůcky

Dialyzační membrána, Merck Darmstadt, Německo

Pipety s nastavitelným objemem Research Eppendorf, Německo

Polykarbonátová kapilární kyveta DTS1060 (Malvern panalytical, Velká Británie)

Polystyrenová jednorázová kyveta DTS0012 (Malvern panalytical, Velká Británie)

Skleněná kyveta, Hellma Analytics, Německo

2.3 Přístroje

Analytické váhy Ohaus Discovery, Ohaus, Švýcarsko

Centrifuga MPW-260R, MPW Med. Instruments, Varšava, Polsko

DSC 200F3Maia, Netzsch, Německo

Hliníkové kelímky Netzsch 100 DSC, Netzsch-Geratebau GmhH, Selb, Německo

Horkovzdušná sušárna, Memmert, Německo

Magnetická míchačka, IKA – WERKERT, Německo

Ruční lis pro uzavření hliníkových kelímků, Netzsch-Geratebau GmhH, Selb, Německo

Spektrofotometr Specord 205, Analytic Jena, Německo

Třepací vodní lázeň Julabo SW22, Německo

Ultrazvukový homogenizátor SONOPULS HD 2070, Bandelin, Německo

Váhy Kern 440-53N, Kern, Německo

Zetasizer Nano ZS90 Malvern Panalytical, Velká Británie

2.4 Postup přípravy nanočástic suspenzně-emulzní metodou

Nanočástice byly připraveny suspenzně-emulzní metodou. Léčivo v pevném stavu (S) bylo suspendováno v organické fázi (O), tvořené polymerem PLGA/T rozpuštěným v dichlormethanu (DCM), za vzniku primární disperze (S/O). Primární disperze byla po kapkách přidána do roztoku PVA ve vodě na injekci, představující vodnou fázi (V), za vzniku sekundární disperze (S/O/V). Následovalo 2hodinové odpařování dichlormethanu na magnetické míchačce při pokojové teplotě, kdy byla získána nanosuspenze.

Na analytických vahách bylo naváženo dané množství PLGA/T (Tab. 1) a v kádince rozpuštěno v 1,5 ml dichlormethanu za vzniku organické fáze (O) o koncentracích 0,5%, 1%, 2%, 3,3%, nebo 4%. K roztoku polymeru bylo přidáno hydrofilní léčivo vankomycin, navážené na analytických vahách (Tab. 1). Pro dispergaci pevné látky do organické fáze byl použit ultrazvuk nastavený na 3 min a 40 % cyklu. Kádinka byla postavena na led a sonda ultrazvuku byla ponořena do roztoku tak, aby se nedotýkala stěn kádinky. Byla tak získána primární disperze (S/O).

Vodná fáze (V) byla připravena rozpuštěním daného množství PVA ve vodě na injekce (Tab. 1) do požadované koncentrace (0,25%, 1%, 1,5%, 2%, nebo 3%) mícháním na magnetické míchačce po dobu 1 hodiny při teplotě 50 °C. Do vodné fáze byla po kapkách přidávána primární disperze za současné sonifikace na ledu ultrazvukem nastaveným na dobu 3 min, s amplitudou 40 % a výkonem 70 %. Nově vytvořená sekundární disperze (S/O/V) byla míchána 2 hodiny na míchačce při 500 ot/min, aby došlo k odpaření dichlormethanu.

Tab.1: Komponenty použité pro formulaci nanočástic a jejich testované koncentrace.

Složka	Množství použité při suspenzně-emulzní metodě [mg]					
VAN	3			5		
PVA	75	112	150	225	450	600
PLGA/T	7,5	15	30	50	60	150

2.5 Měření velikosti, polydisperzity a zeta potenciálu

Měření velikosti nanočástic, polydisperzity a zeta potenciálu bylo provedeno ihned po přípravě nanosuspenze na přístroji Zetasizer Nano ZS 90. Přístroj byl aktivován 30 minut před měřením z důvodu kalibrace na požadovanou teplotu. Injekční stříkačkou byl ze středu kádinky odebrán

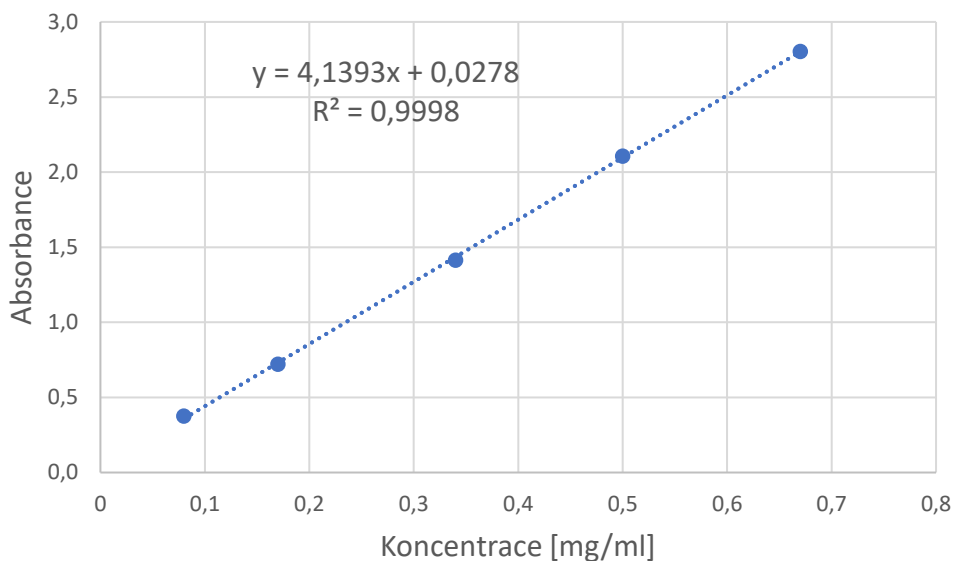
vzorek nanosuspenze a umístěn do kyvety. Každý parametr byl změřen třikrát. Byl vypočítán průměr ze tří měření a směrodatná odchylka průměru.

2.6 Kalibrační přímky

Pro spektrofotometrické stanovení vankomycinu byla sestrojena kalibrační přímka a zjištěna rovnice lineární regrese. Byl připraven roztok vankomycinu ve vodě, ve fosfátovém pufru pH 7,4 a ve 2% roztoku PVA. Z těchto zásobních roztoků byly připraveny roztoky různých koncentrací a byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 280 nm proti vodě (Tab. 2) či proti pufru (Tab. 4), nebo při 281 nm proti roztoku PVA (Tab. 3). Byly sestrojeny kalibrační přímky (Obr. 9 a Obr. 10). Pro vyhodnocení disoluce byla použita kalibrační přímka vankomycinu v pufru (Obr. 11).

Tab. 2: Absorbance roztoků vankomycinu ve vodě při vlnové délce 280 nm.

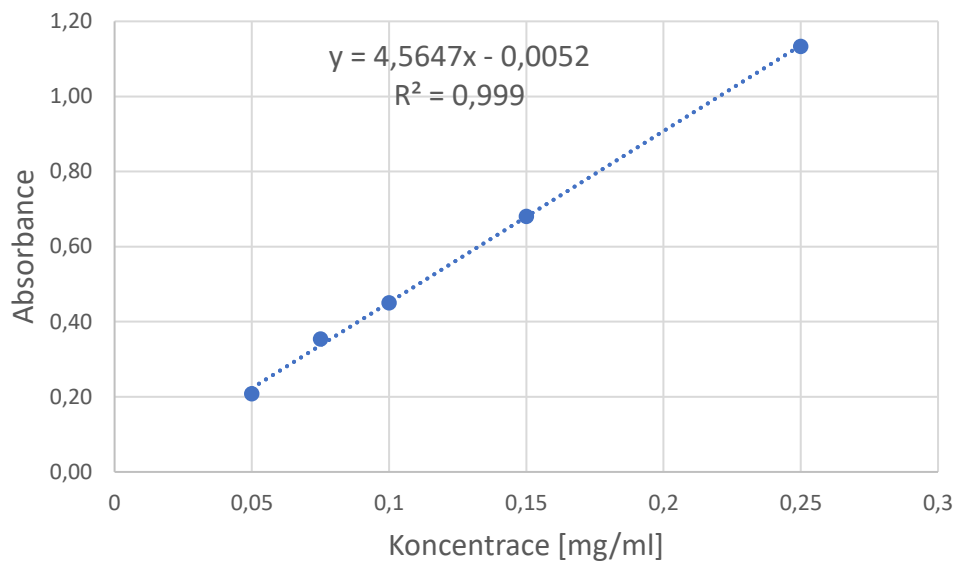
c [mg/ml]	0,08	0,17	0,34	0,50	0,67
A	0,3755	0,7218	1,4149	2,1077	2,8041



Obr. 9: Kalibrační přímka vankomycinu ve vodě.

Tab. 3: Absorbance roztoků vankomycinu ve 2% roztoku PVA při vlnové délce 281 nm.

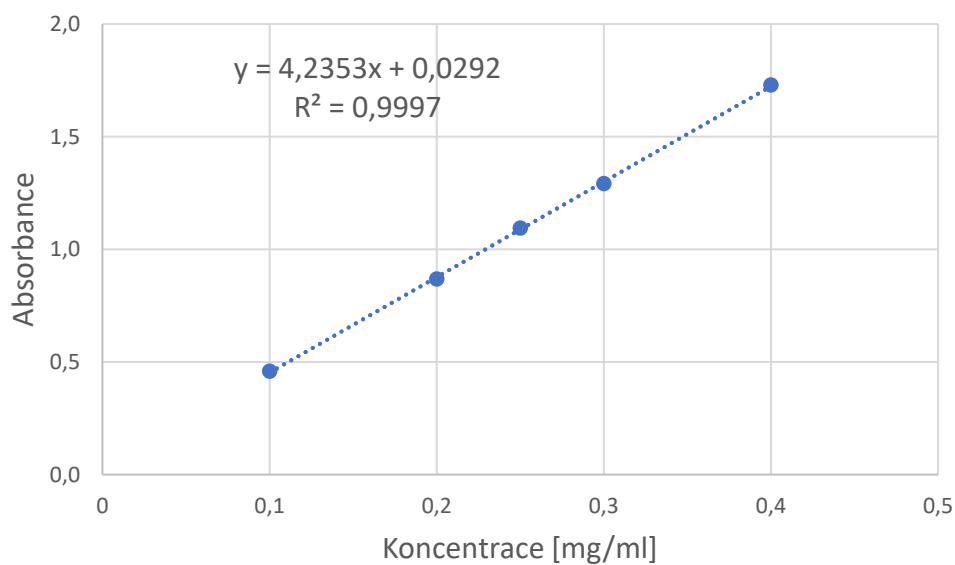
c [mg/ml]	0,05	0,075	0,1	0,15	0,25
A	0,2082	0,3541	0,4503	0,6807	1,1335



Obr. 10: Kalibrační přímka vankomycinu ve 2% roztoku PVA.

Tab. 4: Absorbance roztoků vankomycinu v pufru při vlnové délce 280 nm.

c [mg/ml]	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4
A	0,4588	0,8674	1,0932	1,2917	1,7291



Obr. 11: Kalibrační přímka vankomycinu v pufru.

2.7 Stanovení enkapsulační účinnosti

2.7.1 *Nepřímá metoda*

Připravená nanosuspenze byla rozdělena do 4 centrifugačních zkumavek. Ty byly vloženy do centrifugy nastavené na 15000 ot/min, dobu 20 min a teplotu 4 °C. Za účelem výpočtu enkapsulační účinnosti byl po skončení centrifugace supernatant zvážen a byl odvozen jeho objem. Supernatant byl před měřením naředěn v poměru 1:2 nebo 1:2,5 2% roztokem PVA, aby splňoval rozsah citlivosti UV absorbance 0,2–0,8. Stanovení vankomycinu v supernatantu bylo provedeno měřením absorbance při 281 nm proti 2% roztoku PVA.

2.7.2 *Přímá metoda*

Připravené nanosuspenze byly vloženy do centrifugy a odstředovány podle centrifugace 1 (Tab. 5). U 1% roztoku PVA byl navíc sediment mezi jednotlivými centrifugacemi vždy proplachován 1 ml vody pro injekci. Sedimenty byly sušeny v horkovzdušné sušárně 1 hodinu při teplotě 25 °C. Poté byly k vysušeným sedimentům přidány 2 ml chloroformu, aby se hydrofobní polymer rozpustil a ultrazvukem (10 s, amplituda 40 %) byly částice sedimentu redispersovány. Následně bylo přidáno 6 ml vody za účelem rozpuštění hydrofilního léčiva a vysrážení rozpuštěného polymeru. Vzniklá disperze byla uzavřena do lékovky s míchadlem a vložena na 24 hodin na míchačku. Aby došlo k oddělení vodné (horní vrstva) a organické fáze (spodní vrstva), nechala se po 24hodinovém míchání lékovka stát asi 30 min mimo míchačku. Pipetou byly odebrány 4 ml vodné fáze s vankomycinem a byly rozděleny do 4 centrifugačních zkumavek a vloženy do centrifugy. Současně byla lékovka zpět doplněna 4 ml vody a vložena na míchačku na 30 min. Nově vzniklé disperze byly opakovaně odstředovány podle centrifugací 2–4 (Tab. 5) při teplotě 4 °C, přičemž po každé centrifugaci byla odebrána horní vrstva, u níž bylo zjišťováno zbylé množství vankomycinu pomocí spektrofotometru při absorbanci 280 nm. Pro výpočet byla použita rovnice kalibrační přímky vankomycinu ve vodě (Obr. 9).

Tab. 5: Podmínky centrifugací sekundárních disperzí před přidáním chloroformu (Centrifugace 1) a po přidání chloroformu (Centrifugace 2–4).

Centrifugace	1% disperze		0,25% a 2% disperze	
	RPM ot/min	Čas [min]	RPM ot/min	Čas [min]
1	3000 6000 12000 15000	15	15000	20
2–4	15000	30	10000	15

Enkapsulační účinnost (EE) [%] byla vypočtena podle vzorce:

$$EE = \frac{m_e}{m_t} \cdot 100, \quad (2)$$

kde m_e je množství vankomycinu stanoveného v nanočásticích [mg] a m_t je množství vankomycinu použitého při přípravě [mg].

2.8 DSC

Byla provedena termická analýza vankomycinu, PLGA/T polymeru a nanočástic. Do hliníkových kelímků byly na analytických vahách naváženy vzorky vankomycinu pro měření DSC v rozmezí 5–10 mg, které byly poté slisovány. Přesná hmotnost léčiva byla zjištěna odečtením předem zváženého prázdného kelímku od celkové hmotnosti kelímku po slisování. Kelímky se vzorky byly pinzetou umístěny do přístroje a měřeny proti prázdnému kelímku představující referenční vzorek. V počítačovém programu byly nastaveny parametry měření, jako byla hmotnost léčiva a hmotnost kelímku. Teplotní režim (ohřev, izoterma, chlazení) (Obr. 12) byl upraven podle teploty tání léčiva vyhledané v literatuře a nastaven tak, aby se zahřívalo na teplotu vyšší, než je teplota tání. Ze získaných termogramů byla zjištěna teplota tání vankomycinu z prvního ohřevu, teplota skelného přechodu polymeru v inflexním bodě na křivce druhého ohřevu. Byl vyhodnocen DSC sken nanočástic.

Total Selection		Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	→	1	Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	2	Isothermal	-20.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	3	Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	4	Isothermal	60.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	5	Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	6	Isothermal	-20.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	7	Dynamic	60.0 °C	10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	8	Isothermal	60.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	9	Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	10	Isothermal	20.0 °C	5 min

(a) *Polymer*

Total Selection		Dynamic	Heating	Cooling	Isothermal
<input checked="" type="checkbox"/>	→	1	Dynamic	-20.0 °C	-10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	2	Isothermal	-20.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	3	Dynamic	250.0 °C	10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	4	Isothermal	250.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	5	Dynamic	-20.0 °C	-20.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	6	Isothermal	-20.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	7	Dynamic	250.0 °C	10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	8	Isothermal	250.0 °C	5 min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	9	Dynamic	20.0 °C	-10.0 K/min
<input checked="" type="checkbox"/>	→	10	Isothermal	20.0 °C	5 min

(b) *Vankomycin, polymerní nanočástice*

Obr. 12: Teplotní režimy DSC.

2.9 SEM

Metodou skenovací elektronové mikroskopie byl studován tvar a morfologie nanočástic. Byly připraveny nanočástice tvořené 450 mg PVA rozpuštěným v 22,5 ml vody na injekci a 150 mg PLGA/T ve 4,5 ml dichlormethanu. Vzorky ve formě přečištěné nanosuspenze byly předány Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. (Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, katedry fyziky) pro hodnocení rastrovým elektronovým mikroskopem FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko) v režimu sekundárních elektronů v urychlovacím napětí 15 kV. Vzorky byly před měřením umístěny na uhlíkovou adhezivní pásku, vysušeny při laboratorní teplotě a upraveny nanosením 8 nm vrstvy zlata.

2.10 Disoluce vankomycinu

Pro disoluční testy byly použity nanočástice připravené rozpuštěním 450 mg PVA ve vodě na injekci o objemu 22,5 ml a rozpuštěním 150 mg PLGA/T ve 4,5 ml dichlormethanu. Získané nanosuspenze byly centrifugovány nejdříve při 5 000 ot/min a poté při 15 000 ot/min po dobu 20 minut a teplotě 4 °C. Byl odstraněn supernatant a sedimenty byly vysušeny v horkovzdušné sušárně. K získaným sedimentům byly přidány 2 ml čištěné vody a následovala homogenizace pomocí ultrazvuku (30 s). Byly odpipetovány 2 ml promyté a redispergované nanosuspenze do polopropustné dialyzační membrány, která byla na obou koncích uzavřena. Dialyzační membrány se vzorky byly vloženy do vialek a byly přidány 4 ml disolučního média. Jako disoluční medium byl použit fosfátový pufr pH 7,4 (PBS 7,4), předem zahřátý na 37 °C. Disoluce probíhala v třepací vodní lázni při 37 °C a frekvenci 80 kmitů/min. V daných časových intervalech (3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 a 120 hodin) bylo disoluční médium odebráno a následně byly do každé vialky opět přidány 4 ml disolučního média z důvodu zachování *sink* podmínek. Vankomycin byl stanoven spektrofotometrickým měřením absorbance při 280 nm proti fosfátovému pufru pH 7,4. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Množství uvolněného vankomycinu bylo vypočteno na základě rovnice kalibrační přímký (Obr. 11) a stanovené enkapsulační účinnosti.

3 VÝSLEDKY

3.1 Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic

Tab. 6: Charakteristiky nanočástic (2% PVA a 5 mg VAN) – vliv koncentrace PLGA/T.

PLGA/T [%]	Velikost [nm]	Polydisperzita	ZP [mV]
0,5	521,6	0,294	-1,020
	511,0	0,273	-0,501
	512,8	0,282	-0,563
průměr ± SD	515,13 ± 3,275	0,283 ± 0,006	-0,695 ± 0,164
1	443,9	0,111	-0,610
	442,4	0,157	-0,428
	438,9	0,144	-0,418
průměr ± SD	441,73 ± 1,481	0,137 ± 0,014	-0,485 ± 0,004
2	569,5	0,244	-1,320
	573,4	0,225	-1,710
	563,9	0,244	-1,200
průměr ± SD	568,93 ± 2,757	0,238 ± 0,006	-1,410 ± 0,208
4	534,8	0,131	-0,313
	522,6	0,167	-0,416
	522,5	0,158	-0,422
průměr ± SD	526,63 ± 4,083	0,152 ± 0,011	-0,384 ± 0,002

Tab. 7: Charakteristiky nanočástic (3,3% PLGA/T a 2% PVA) – vliv množství VAN.

VAN [mg]	Velikost [nm]	Polydisperzita	ZP [mV]
10	528,8	0,164	-0,186
	531,9	0,175	-0,318
	523,6	0,184	-0,274
průměr ± SD	528,10 ± 2,421	0,174 ± 0,006	-0,259 ± 0,039
15	542,2	0,162	-0,091
	547,9	0,148	-0,108
	537,2	0,131	-0,052
průměr ± SD	542,43 ± 3,091	0,147 ± 0,009	-0,084 ± 0,017
20	511,9	0,105	-0,017
	506,1	0,09	-0,031
	500,2	0,128	-0,155
průměr ± SD	506,07 ± 3,378	0,108 ± 0,011	-0,068 ± 0,044
25	527,1	0,17	-0,108
	512,7	0,214	-0,111
	514,9	0,144	0,040
průměr ± SD	518,23 ± 4,479	0,176 ± 0,020	-0,060 ± 0,050

Tab. 8: Charakteristiky nanočástic (3,3% PLGA/T a 5 mg vankomycinu) – vliv koncentrace PVA.

PVA [%]	Velikost [nm]	Polydisperzita
1,0	335,5	0,089
	336,9	0,102
	334,5	0,118
průměr ± SD	335,63 ± 0,696	0,103 ± 0,008
1,5	434,0	0,138
	430,0	0,16
	420,2	0,159
průměr ± SD	428,10 ± 4,100	0,152 ± 0,007
2,0	497,5	0,093
	501,3	0,123
	492,4	0,18
	563,4	0,117
	553,9	0,135
	549,7	0,134
průměr ± SD	526,37 ± 13,278	0,130 ± 0,012
3,0	741,2	0,164
	721,4	0,202
	742,8	0,116
průměr ± SD	735,10 ± 6,882	0,161 ± 0,025

3.2 Enkapsulační účinnost

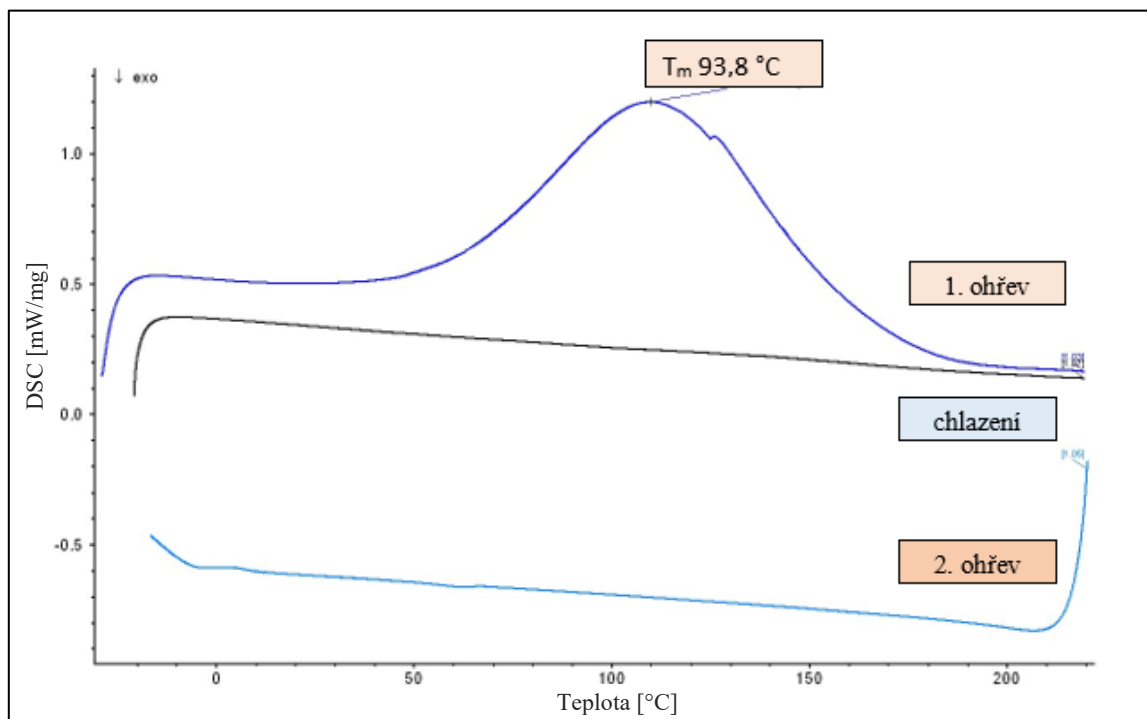
Tab. 9: Enkapsulační účinnost vypočtená nepřímou metodou.

PVA [%]	PLGA/T [%]	EE [%]
2	1	37,66
2	2	39,18
2	4	50,89

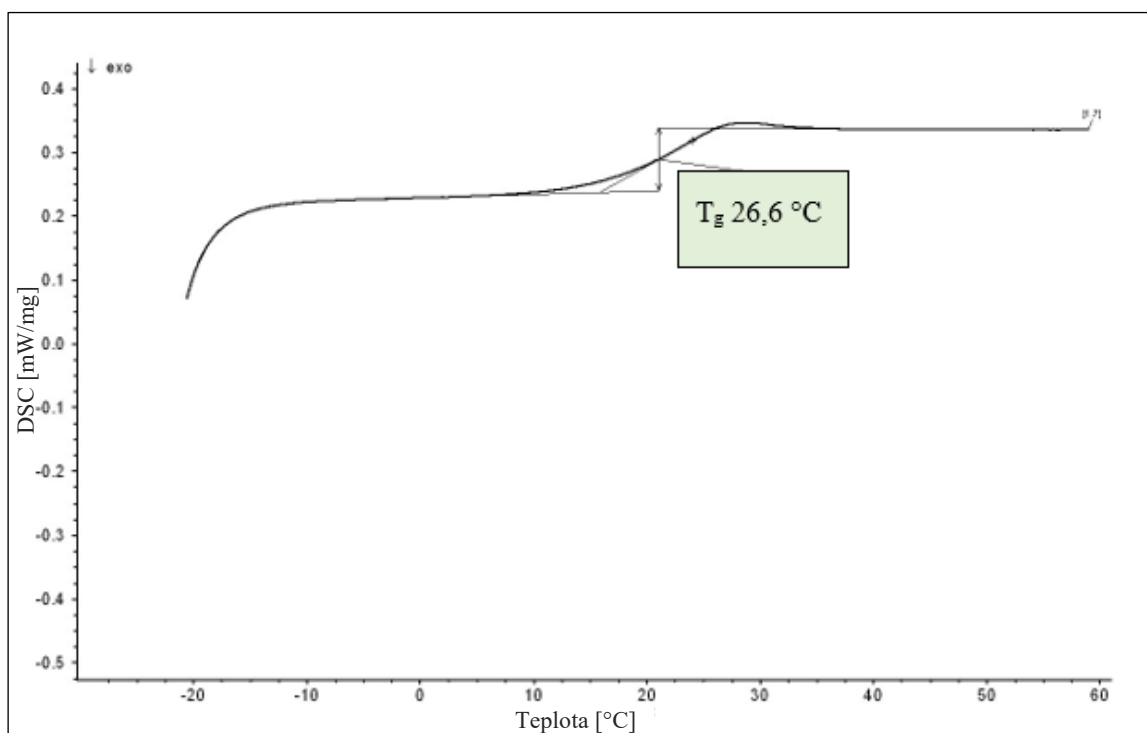
Tab. 10: Enkapsulační účinnost vypočtená přímou metodou.

PVA [%]	PLGA/T [%]	Použité množství VAN [mg]	Množství [mg]	Σ [mg]	EE [%]
0,25	1,0	3	0,015 0,005 0,000	0,02	0,71
1,00	3,3	5	0,040 0,020 0,000	0,06	1,14
2,00	3,3	5	0,110 0,060 0,050	0,22	4,40

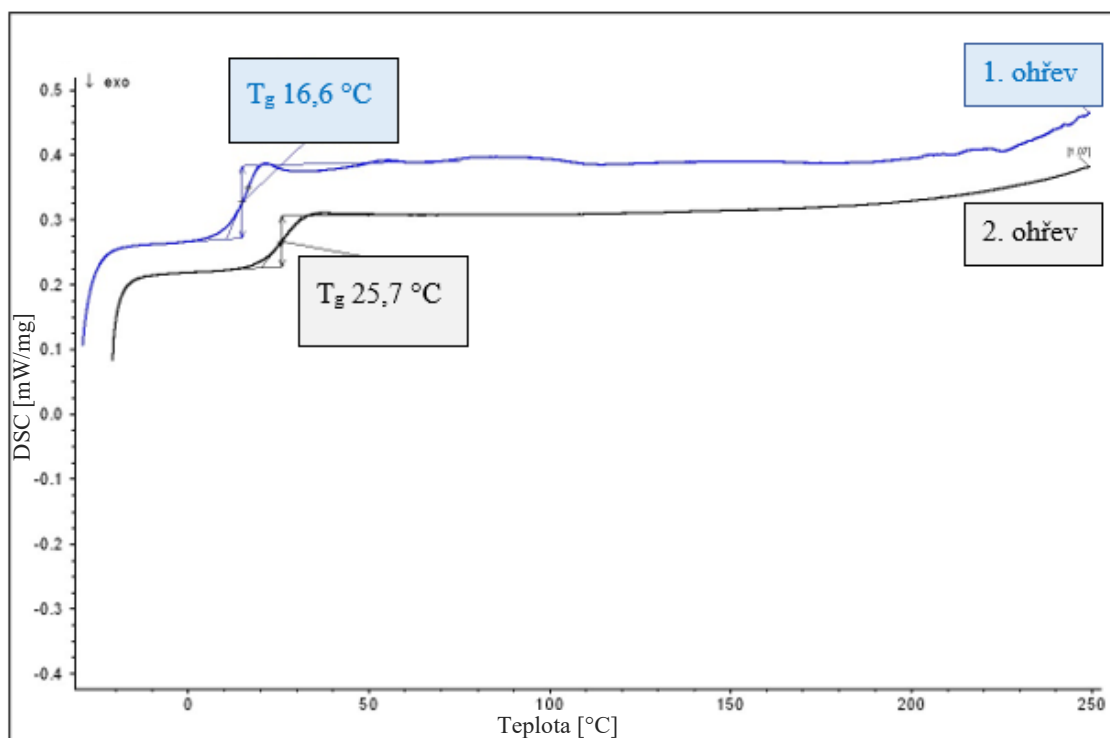
3.3 DSC



Obr. 13: DSC sken vankomycin-hydrochloridu.

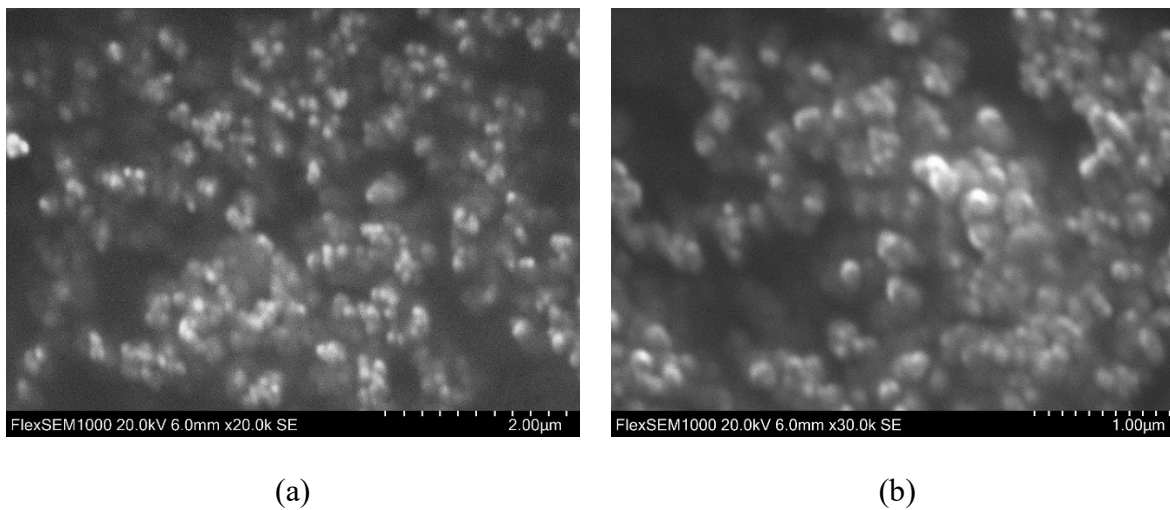


Obr. 14: DSC sken PLGA/T.



Obr. 15: DSC sken PLGA/T nanočástic připravených suspenzně-emulzní metodou.

3.4 SEM



Obr. 16: Snímky PLGA/T nanočástic ze skenovacího elektronového mikroskopu. Zvětšení 20000× (a) a 30000× (b).

3.5 Liberace vankomycinu z nanočástic

Tab. 11 a–c: Množství vankomycinu uvolněného z PLGA/T nanočástic

a) vzorek 1

čas [hod]	A	c [mg/ml]	Vankomycin [mg]	Vankomycin [%]	Vankomycin [kumulativní %]
3	0,8498	0,1937	1,16	29,65	29,65
6	0,4736	0,1049	0,24	6,18	35,83
12	0,4294	0,0945	0,36	9,11	44,94
24	0,6376	0,1436	0,67	17,17	62,11
36	0,5168	0,1151	0,40	10,29	72,40
48	0,3838	0,0837	0,27	6,94	79,34
72	0,4405	0,0971	0,42	10,59	89,93
96	0,3711	0,0807	0,29	7,40	97,33
120	0,2194	0,0449	0,11	2,75	100,08

b) vzorek 2

čas [hod]	A	c [mg/ml]	Vankomycin [mg]	Vankomycin [%]	Vankomycin [kumulativní %]
3	0,8585	0,1958	1,17	29,97	29,97
6	0,4733	0,1048	0,24	6,06	36,03
12	0,4291	0,0944	0,36	9,10	45,13
24	0,6434	0,1450	0,68	17,38	62,51
36	0,5169	0,1152	0,40	10,23	72,74
48	0,3836	0,0837	0,27	6,93	79,67
72	0,4415	0,0973	0,42	10,63	90,30
96	0,3711	0,0807	0,29	7,39	97,69
120	0,2195	0,0449	0,11	2,76	100,45

c) vzorek 3

čas [hod]	A	c [mg/ml]	Vankomycin [mg]	Vankomycin [%]	Vankomycin [kumulativní %]
3	0,8597	0,1961	1,18	30,01	30,01
6	0,4730	0,1048	0,24	6,03	36,04
12	0,4292	0,0945	0,36	9,11	45,15
24	0,6419	0,1447	0,68	17,32	62,47
36	0,5169	0,1152	0,40	10,24	72,71
48	0,3835	0,0837	0,27	6,93	79,64
72	0,4416	0,0974	0,42	10,63	90,27
96	0,3705	0,0806	0,29	7,37	97,64
120	0,2199	0,0450	0,11	2,78	100,42

4 DISKUZE

Pro přípravu nanočástic s vankomycinem byla použita metoda suspenzně-emulzní (viz podkap. 1.3.1) popsaná v literatuře jako vhodná metoda pro enkapsulaci hydrofilních léčiv [81]. Tato metoda se řadí k metodám dvojitého odpařování rozpouštědla spadající mezi techniky *top-down*. Je využívána k překonání určitých problémů jako je např. nízká účinnost enkapsulace, nebo vysoký burst při uvolňování léčiva, které obvykle nastávají při enkapsulaci hydrofilních léčiv metodou dvojité emulze V/O/V. Byl testován vliv formulačních faktorů na velikost, polydisperzitu, zeta potenciál, termické charakteristiky a morfologii nanočástic a vliv na enkapsulační účinnost a liberaci vankomycinu z nanočástic (jednotlivé charakteristiky NČ viz kap. 1.4). Pro formulaci nanočástic byl zvolen polymer PLGA rozvětvený na tripentaerythritolu v různých koncentracích. Charakteristiky polymeru jsou uvedeny v Tab. 12 [98].

Tab. 12: Číselné (M_n) a hmotnostní (M_w) průměry molární hmotnosti, hmotnostní průměr vnitřní viskozity $[\eta]_w$, větvící poměr $g'(M_w)$ a teplota skelného přechodu (T_g).

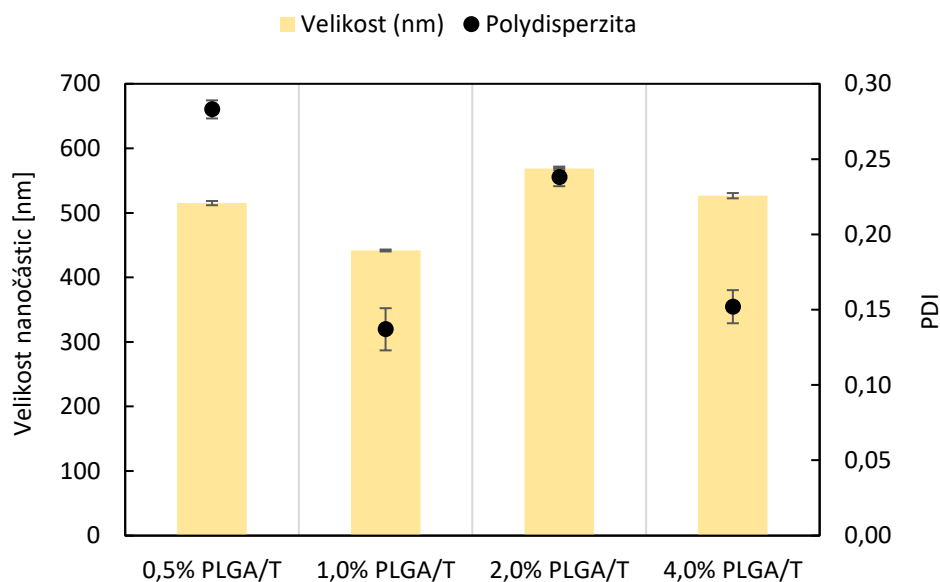
Polymer	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	$[\eta]_w$ [mL/g]	g' [M_w]	T_g [°C]
PLGA/T	5 300	17 400	7,7	0,43	26,6

Molární hmotnost použitého PLGA ovlivňuje uvolnění aktivní látky z aplikačních systémů. Polymer PLGA byl syntetizován stupňovou kopolymerací bez použití katalyzátorů ze směsi kyseliny glykolové a kyseliny D,L-mléčné v poměru 50:50 a 3% tripentaerythritolu jako větvícího činidla [99].

Zvoleným rozpouštědlem pro polymer PLGA/T byl dichlormethan. Jeho nevýhodou, stejně jako ostatních organických rozpouštědel, je nevyhovující toxikologický profil. Součástí vodné fáze byl zvolen neiontový stabilizátor PVA s vysokou molární hmotností, který stéricky zvyšuje stabilitu vnitřní emulze zvýšením viskozity vodného roztoku. Molekulová hmotnost a koncentrace polymeru pozitivně koreluje s viskozitou organické fáze, která následně koreluje s konstantou difúze léčiva [100]. Právě tyto charakteristiky (vysoká molární hmotnost a zvýšená viskozita vodné fáze) zvyšují enkapsulaci hydrofilního léčiva do nanočástic [101]. Ve studii Chaisri a kol. (2011) vedlo zvýšení koncentrace PLGA v dichlormethanu z 10% na 15% ke zvýšení EE gentamicinu ze 17 % na 68 % [100]. Klíčovým faktorem ovlivňující velikost nanočástic je považována koncentrace PVA ve vnější vodné fázi [102]. V předložené diplomové práci byl PVA použit v koncentracích 1%, 1,5%, 2% a 3%.

4.1 Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic

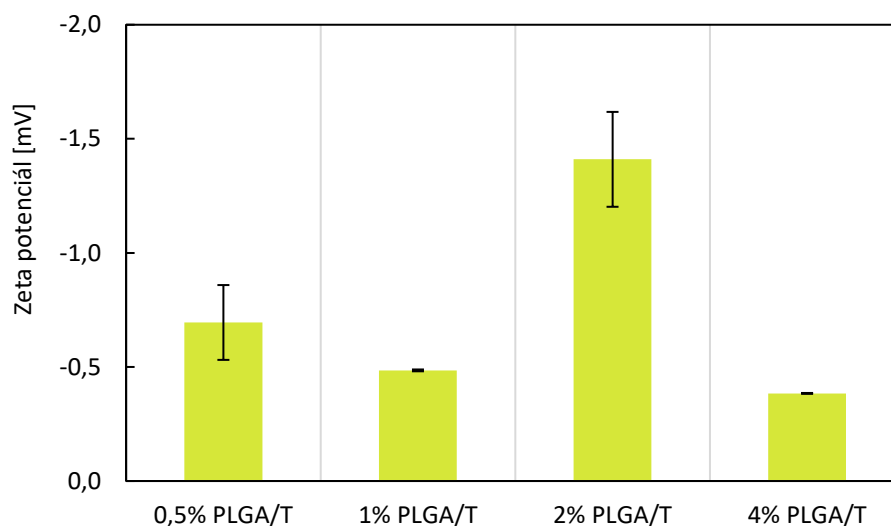
Byl studován vliv koncentrace polymeru PLGA/T, stabilizátoru PVA a množství vankomycinu na velikost a zeta potenciál nanočástic. Velikost nanočástic bývá doplněna bezrozměrnou hodnotou polydisperzity, přičemž soustavy s hodnotami nižšími než 0,2 lze považovat za monodisperzní [103]. Zeta potenciál souvisí se stabilitou nanočástic. Nanočástice se zeta potenciálem nad ± 30 mV jsou stabilní, protože povrchový náboj zabraňuje agregaci částic elektrostatickým odpuzováním. Naměřené hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu jsou uvedeny v Tab. 6–8. Na Obr. 17 je porovnána velikost nanočástic při použití různé koncentrace polymeru PLGA/T. Zvýšení koncentrace polymeru vede ke zvýšení viskozity organické fáze. Tím se zvýší odpor proti smykovému napětí, kterým je homogenizována primární disperze a ve výsledku to vede ke zvětšení velikosti nanočástic. Byla proto očekávána rostoucí velikost částic s rostoucí koncentrací polymeru. Avšak největší velikost byla naměřena u částic tvořených 2% PLGA/T a naopak nejmenší hodnotu vykazovaly částice u 1% PLGA/T. Velikost nanočástic byla v rozmezí přibližně 440 až 570 nm. Nanočástice nevykazovaly vždy optimální hodnoty PDI. Nejvyšší polydisperzitu měly nanočástice tvořené 0,5% PLGA/T. Průměrná hodnota PDI byla 0,203.



Obr. 17: Závislost velikosti nanočástic na koncentraci PLGA/T.

Na Obr. 18 je znázorněn vliv koncentrace PLGA/T na zeta potenciál. U všech formulací byl zjištěn záporný náboj, který je způsoben ionizací koncových skupin větveného PLGA/T polymeru. Byly naměřeny velmi nízké hodnoty zeta potenciálu, protože v průběhu suspenzně-

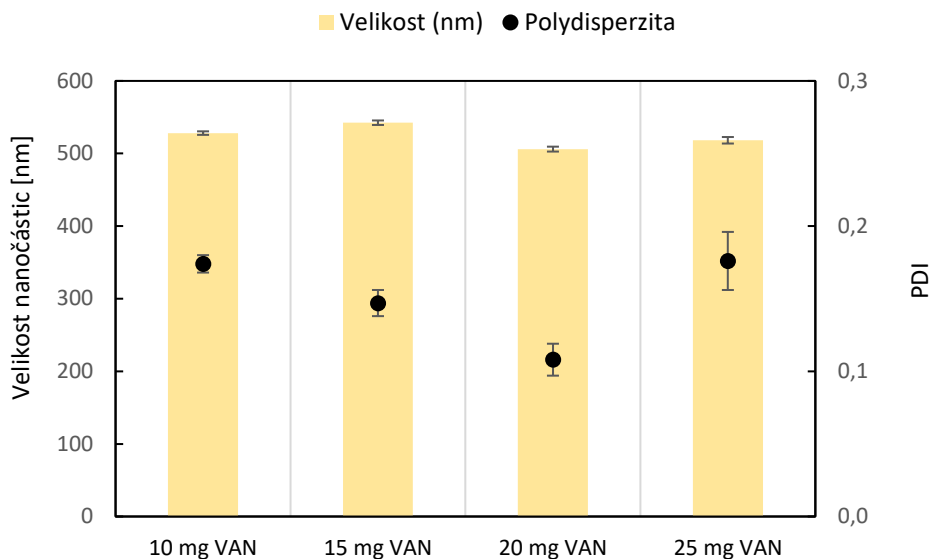
emulzní metody přípravy nanočástic byl jako stabilizátor použit PVA, který nanočástice stabilizuje stericly, nikoli elektrostaticky. Nejvyšší naměřená hodnota zeta potenciálu byla 1,41 mV u 2% PLGA/T. Zjištěné hodnoty PDI a rovněž SEM snímky nanočástic potvrzují relativně dostatečnou stabilitu připravených nanočástic. Další možnost, jak nanočástice stabilizovat, je uchovávání nanočástic v lyofilizovaném stavu [102].



Obr. 18: Závislost zeta potenciálu na koncentraci PLGA/T v přítomnosti 2% PVA.

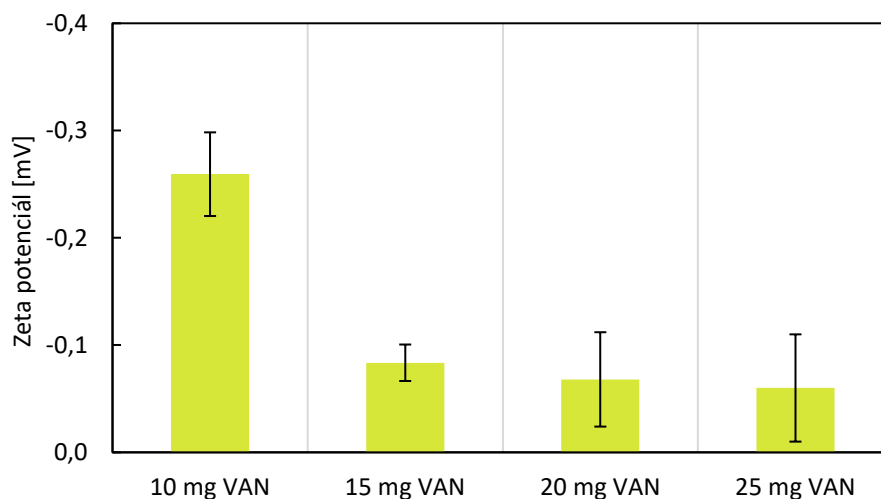
Na Obr. 19 je porovnána velikost nanočástic při použití různých navážek vankomycinu. V literatuře jsou prezentovány obě alternativy, a sice že se zvyšujícím se obsahem léčiva se velikost nanočástic zvyšuje [104]. Při srovnání PLGA nanočástic s léčivem a bez léčiva bylo zjištěno, že inkorporací indometacinu nebo ketoprofenu nebyla velikost částic významně ovlivněna [105].

V našem případě byla největší velikost naměřena u nanočástic s navázkou vankomycinu 15 mg a nejmenší u nanočástic s 20 mg vankomycinu. Rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší velikostí činil pouze 36,36 nm ve srovnání se studií F. Madani, kde rozdíl mezi nejmenší a největší velikostí nanočástic, obsahující léčivo v rozmezí navážek 1 až 6 mg, činil 152 nm [104]. Průměrná hodnota PDI u disperzí tvořenými 3,3% PLGA/T a 2% PVA vyšla 0,151.



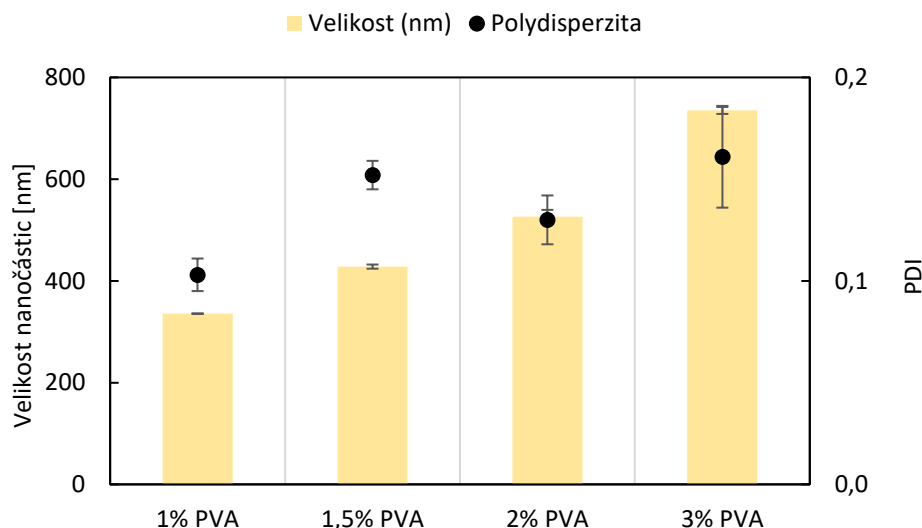
Obr. 19: Závislost velikosti nanočástic na množství vankomycinu při použití 3,3% PLGA/T a 2% PVA.

Na Obr. 20 je vidět vliv zvyšujícího se množství léčiva na pokles hodnot zeta potenciálu. V důsledku interakce záporně ionizovaných skupin polymeru a léčiva s kladným nábojem na povrchu částic, byl tento jev v souladu s očekáváním. Jak bylo zmíněno výše, velmi nízké hodnoty zeta potenciálu souvisí se sterickou stabilizací PVA, kdy tak může dojít k maskování zeta potenciálu. Proto připravené nanočástice nelze jednoznačně považovat za nestabilní.



Obr. 20: Závislost zeta potenciálu na množství vankomycinu v přítomnosti 3,3% PLGA/T a 2% PVA.

Na Obr. 21 je vidět vliv koncentrace PVA na velikost nanočástic. Na základě studií byla předpokládána rostoucí velikost nanočástic s rostoucí koncentrací PVA [104]. V naší studii byl vliv PVA v souladu s očekáváním, přičemž velikost nanočástic se zvýšila z hodnoty 335 nm na 735 nm. Průměrná hodnota PDI vyšla 0,137.



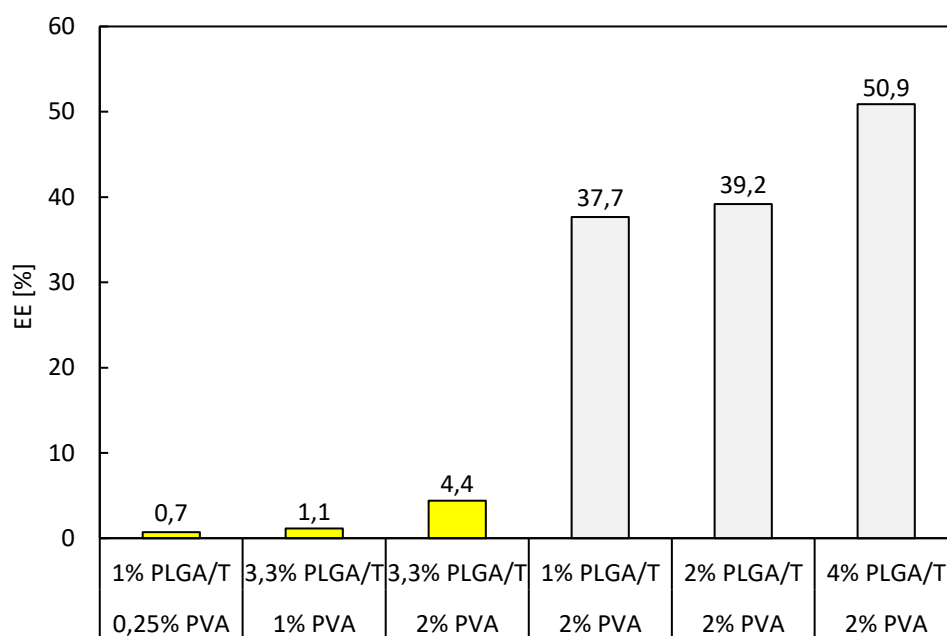
Obr. 21: Závislost velikosti nanočástic na koncentraci PVA v přítomnosti 3,3% PLGA/T.

4.2 Enkapsulační účinnost

Enkapsulační účinnost je procento léčivé látky v nanočásticích z celkově použitého množství léčiva při přípravě [106]. Inkorporace vankomycinu do nanočástic bývá zpravidla obtížná kvůli jeho vysoké hydrofilní povaze. Pro stanovení EE se obecně používají dvě metody. Metoda přímá, kdy se EE vypočítá měřením koncentrace léčiva zachyceného v nanočásticích, a metoda nepřímá, která je stanovena výpočtem koncentrace nezapouzdřeného léčiva ve vodné fázi (supernatantu). Pro měření EE jsou stejně použitelné obě metody. Na základě výsledků předchozích studií nepředstavuje vypočítaná hodnota EE vždy přesné procento zachycené drogy [107]. Obecně EE stanovená nepřímou metodou vykazuje vyšší podíl inkorporované léčivé látky než u stanovení EE přímo v částicích. Enkapsulační účinnost byla stanovena u nanočástic připravených z různých poměrů koncentrací PLGA/T a PVA. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 9 a 10.

Na Obr. 22 je porovnána účinnost enkapsulace stanovená přímou a nepřímou metodou a vliv množství použitého polymeru a stabilizátoru. EE stanovená přímou metodou je v rozmezí 0,7 až 4,4 %. EE stanovená nepřímou metodou je výrazně vyšší, a to v rozmezí 37,7 až 50,9 %. Byl zjištěn vliv množství polymeru PLGA/T a stabilizátoru PVA použitého při suspenzně-

emulzní metodě přípravy nanočástic na enkapsulační účinnost. Množství zachycené léčivé látky bylo nejvyšší u nanočástic tvořených 4% PLGA/T a 2% PVA stanovené nepřímou metodou. Ve srovnání se studií D. Masella, kde byla porovnávána EE stanovená přímou a nepřímou metodou, vykazovaly výsledky stanovené nepřímou metodou téměř stejné, nebo vyšší hodnoty EE [108]. Srovnatelné výsledky enkapsulace vankomycinu stanovené nepřímou metodou byly zjištěny ve studii P. Zakeri-Milani, kde účinnost zachycení se pohybovala mezi 38,4 % a 78,6 % [102]. Nízká účinnost enkapsulace může být způsobena rozpustností daného léčiva ve vodě, což potvrzuje studie enkapsulační účinnosti ketoprofenu ($40,2 \pm 0,3$ %) a indometacinu ($65,2 \pm 0,6$ %) do PLGA nanočástic. Horší enkapsulace ketoprofenu je dána jeho vyšší rozpustností ve vodě, zatímco indometacin během přípravy nanočástic vykazuje menší únik do vodné fáze, z čehož vyplývá vyšší enkapsulační účinnost [82].



Obr. 22: Závislost enkapsulační účinnosti EE (%) přímou metodou (žluté sloupce) a nepřímou metodou (šedé sloupce) na koncentraci polymeru PLGA/T a stabilizátoru PVA.

4.3 DSC

DSC je metoda termické analýzy zabývající se studiem tepelných fyzikálních dějů v materiálech (princip metody viz podkap. 1.4.3). Přípravu vzorků a postup práce shrnuje kap. 2.8.

Na základě naměřených DSC křivek byly vyhodnoceny termofyzikální vlastnosti vzorků, v našem případě teplota tání vankomycinu a teplota skelného přechodu polymeru PLGA/T s inkorporovaným léčivem a bez léčiva.

Na základě Obr. 13, z DSC křivky odpovídající prvnímu ohřevu, byla odečtena teplota tání vankomycinu a vyšla 93,8 °C. Následným ochlazením nedošlo k opětovné krystalizaci léčiva.

Na Obr. 14 je zobrazen termogram polymeru PLGA/T. Jelikož na DSC křivce nebyl naměřen žádný pík (skoková změna termodynamických veličin), jedná se o amorfní polymer. Teplota skelného přechodu PLGA/T vyhodnocená v inflexním bodě druhého ohřevu vyšla 26,6 °C. Následně byl proveden sken nanočástic PLGA/T s vankomycinem (Obr. 15) připravených suspenzně-emulzní metodou. Na DSC křivce prvního ohřevu není patrný pík krystalické fáze vankomycinu, ale byl zjištěn jeden skelný přechod při teplotě 16,6 °C, čemuž odpovídá amorfní fáze léčiva. V druhém ohřevu je zaznamenána T_g 25,7 °C, což je teplota přibližně o jeden stupeň nižší než teplota skelného přechodu samotného polymeru PLGA/T. Vankomycin v nanočásticích působí mírně plastifikačně. Lze předpokládat, že při vyšším obsahu vankomycinu v nanočásticích bude plastifikační účinek vyšší.

Zjištěné výsledky korespondují se studií, ve které byly porovnány termální charakteristiky PLGA nanočástic s ketoprofenem s nanočásticemi bez léčiva, s fyzikální směsí PLGA a ketoprofenu a s PLGA polymerem. T_g nanočástic s ketoprofenem byla nižší než T_g nanočástic PLGA bez léčiva a T_g fyzikální směsi polymeru a léčiva. V křivce DSC částic PLGA s obsahem ketoprofenu nebyl pozorován žádný pík tání léčiva, což naznačuje, že léčivo bylo přítomno v nekrytalickém stavu [109]. PLGA nanočástice bez léčiva měly T_g nižší než čistý polymer PLGA, což je způsobeno výrobním procesem. DSC křivka fyzikální směsi PLGA a ketoprofenu vykazovala pík krystalické fáze ketoprofenu [110]. Podobný, ale mírně nižší posun T_g byl také pozorován u nanočástic obsahujících indometacin [105].

Ze studií prezentovaných v literatuře i z výsledků předloženého experimentu vyplývá, že jak výrobní proces, tak dispergované léčivo mohou ovlivnit konformaci molekulárních řetězců polymeru a vést ke snížení teploty skelného přechodu.

4.4 SEM

Morfologie studovaných nanočástic byla ověřena pomocí skenovací elektronové mikroskopie v režimu sekundárních elektronů (SE). Snímky prokázaly sférický tvar (Obr. 16). Pomocí softwarového vyhodnocení byla rovněž ověřena velikost konkrétních jednotlivých nanočástic, která do značné míry korelovala s výsledky zjištěnými metodou dynamického rozptylu světla.

SEM analýza je důležitou metodou charakterizace nanočástic. Vysoce monodisperzní PLGA nanočástice byly prezentovány na SEM snímcích nanočástic připravených systémem Fluidic

NanoPrecipitation System (FNPS). Průměr PLGA nanočástic lze řídit průtokovými rychlostmi a koncentracemi PLGA [111]. SEM a TEM snímky nanočástic PLGA vyrobených mikrokanálovou emulgací v interdigitálním mikromixéru demonstrují vliv různých formulačních podmínek, zejména doby a intenzity homogenizace a teploty, na morfologii nanočástic [112].

4.5 Liberace vankomycinu z nanočástic

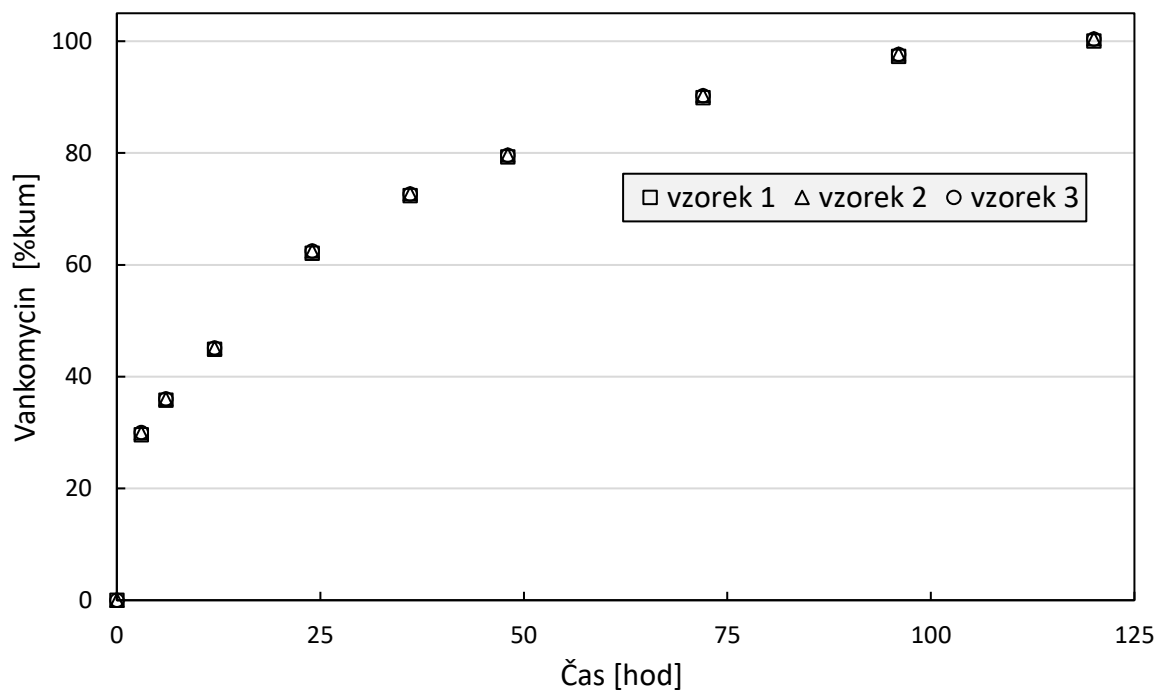
Z důvodu hydrofilní povahy vankomycinu dochází ihned po kontaktu s vodným prostředím k jeho difúzi. Cílem této diplomové práce bylo zajistit prodloužené uvolňování antibiotika jeho inkorporací do polymeru PLGA/T a formulací nanočástic. Jako hlavní faktor ovlivňující rychlost uvolňování léčiva z polymerních nanočástic je velikost částic. Nanočástice mají velký povrch, na kterém se může nacházet určité množství léčiva, které se může okamžitě uvolnit [113]. Problémy související s malou velikostí nanočástic (agregace a burst-efekt) je nutné nejdříve překonat, aby byly vhodné pro klinické použití.

Pro disoluční testy byly vybrány nanočástice, při jejichž přípravě byly použity 2% PVA, 3,3% PLGA a 5 mg vankomycinu. Tyto nanočástice měly velikost 526 nm, PDI 0,10 a EE 4,40 %.

Průběh liberace vankomycinu z nanočástic je zobrazen na Obr. 23. U všech tří vzorků byl disoluční profil vankomycinu téměř shodný. Liberace vankomycinu v počáteční fázi vykazovala burst-efekt, kdy se za 3 hodiny z nanočástic uvolnilo necelých 30 %. Během prvního dne bylo uvolněno přibližně 62 % enkapsulovaného vankomycinu. Dále následovalo pomalejší exponenciální uvolňování zbylého léčiva. Zpožděné exponenciální uvolňování je způsobeno difúzi rozpuštěného léčiva v polymerních nanočásticích do disolučního média. Do 3. dne se uvolnilo téměř 80 % léčiva.

Vysoký burst-efekt zaznamenaný při uvolňování vankomycinu byl zkoumán v několika studiích a byl vysvětlen vlivem rozpustnosti léčiva na průběh uvolňování. Liberace haloperidolu ($C_s = 0,13$ mg/ml ve vodě) z pelet tvořených PLGA (50:50; M_w 63 000) vykazovala burst-efekt ve výši 1 %, zatímco u rozpustnějšího ibuprofenu ($C_s = 0,47$ mg/ml ve vodě) byl burst-efekt ve výši 10 % [114]. Nanočástice obsahující etoprofen a indometacin vykazovaly 24hodinový burst-efekt ve výši 42,2 % resp. 26,3 % [105]. Ve vodě rozpustný gentamicin (50 mg/ml) během 24 hodin vykazoval téměř 50% burst-efekt z PLGA nanočástic [115].

Rozpustnost vankomycinu ve vodě je mnohonásobně vyšší (>100 mg/ml), a tím lze vysvětlit zjištěný vysoký burst-efekt z PLGA/T nanočástic [105].



Obr. 23: Průběh liberace vankomycinu z PLGA/T nanočástic.

5 ZÁVĚR

Polymerní nanočástice PLGA/T s hydrofilním léčivem vankomycin byly formulovány suspenzně-emulzní metodou. Byl studován vliv koncentrace polymeru PLGA/T, stabilizátoru PVA a množství vankomycinu na velikost a zeta potenciál nanočástic. Velikost připravených nanočástic byla spektrofotometricky zjištěna v rozmezí 330 až 740 nm. Rozdílná koncentrace PVA, ve funkci stabilizátoru sekundární disperze, měla vliv na velikost připravených nanočástic, zatímco různé množství použitého léčiva velikost významně neovlivnilo.

U připravených nanočástic byl naměřen záporný náboj, související s ionizací koncových skupin větveného PLGA/T polymeru. Naměřené hodnoty zeta potenciálu byly ovlivněny stérickou stabilizací neionogenního stabilizátoru PVA. Na základě polydisperzity stanovené pomocí Zetasizeru lze většinu připravených nanočástic považovat za monodisperzní.

Nízká enkapsulační účinnost (EE) byla způsobená hydrofilní povahou vankomycinu, kdy během přípravy nanočástic velká část léčiva unikla do vodné fáze. Nejvyšší EE byla 50,9 % u nanočástic tvořených 4% PLGA/T a 2% PVA. Byl zjištěn vliv množství polymeru PLGA/T a stabilizátoru PVA na EE. Přítomnost vankomycinu rozpuštěného v polymerních nanočásticích byla prokázána DSC měřením. Snímky SEM potvrdily sférický tvar nanočástic.

Během prvního dne liberace vankomycinu došlo k burst-efektu, přičemž se z polymerních nanočástic uvolnilo přibližně 60 % léčiva. Uvolňování následně probíhalo do 3. dne, kdy se téměř 80 % vankomycinu uvolnilo.

V dalších experimentech by bylo přínosné zaměřit se na nízkou účinnost enkapsulace, například použitím kombinace polymerních nosičů, změnou stabilizátorů nebo méně rozpustné formy léčiva.

6 LITERATURA

- [1] HAMPLOVÁ, K., Polymerní nanočástice s rifampicinem. Diplomová práce, 2020, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.
- [2] BIELESZOVÁ, D., Studium liberace terbinafinu z PLGA nanočástic. Diplomová práce, 2019, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.
- [3] HOLAS, A., Hodnocení účinnosti enkapsulace terbinafinu do polyesterových nanočástic. Diplomová práce, 2019, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.
- [4] PTÁČKOVÁ, K., Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí II. Diplomová práce, 2023, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.
- [5] KOLINSKY, Daniel C. a Stephen Y. LIANG. Musculoskeletal Infections in the Emergency Department. *Emergency Medicine Clinics of North America* [online]. 2018, **36**(4), 751–766. ISSN 07338627. Dostupné z: doi:10.1016/j.emc.2018.06.006
- [6] NAPAUMPAIPORN, Chaikiat a Wanruchada KATCHAMART. Clinical manifestations and outcomes of musculoskeletal nontuberculous mycobacterial infections. *Rheumatology International* [online]. 2019, **39**(10), 1783–1787. ISSN 0172-8172. Dostupné z: doi:10.1007/s00296-019-04392-8
- [7] HINES, Jeremy T., et al. Osteonecrosis of the Femoral Head: an Updated Review of ARCO on Pathogenesis, Staging and Treatment. *Journal of Korean Medical Science* [online]. 2021, **36**(24). ISSN 1011-8934. Dostupné z: doi:10.3346/jkms.2021.36.e177
- [8] GILADI, A. M., S. MALAY a K. C. CHUNG. A systematic review of the management of acute pyogenic flexor tenosynovitis. *Journal of Hand Surgery (European Volume)* [online]. 2015, **40**(7), 720–728. ISSN 1753-1934. Dostupné z: doi:10.1177/1753193415570248
- [9] BENEŠ Jiří et al. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1.

- [10] SHARFF, Katie A., Eric P. RICHARDS a John M. TOWNES. Clinical Management of Septic Arthritis. *Current Rheumatology Reports* [online]. 2013, **15**(6), 332. ISSN 1523-3774. Dostupné z: doi:10.1007/s11926-013-0332-4
- [11] GARCÍA-ARIAS, Miriam, Alejandro Balsa a Emilio Martín MOLA. Septic arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* [online]. 2011, **25**(3), 407–421. ISSN 15216942. Dostupné z: doi:10.1016/j.berh.2011.02.001
- [12] RAO, Nalini, Bruce H. ZIRAN a Benjamin A. LIPSKY. Treating Osteomyelitis: Antibiotics and Surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2011, **127**, 177S-187S. ISSN 0032-1052. Dostupné z: doi:10.1097/PRS.0b013e3182001f0f
- [13] SCHLICKWEI, Carsten W., Sinef YARAR a Johannes M. RUEGER. Eluting antibiotic bone graft substitutes for the treatment of osteomyelitis in long bones. A review: evidence for their use? *Orthopedic Research and Reviews* [online]. 2014, 71. ISSN 1179-1462. Dostupné z: doi:10.2147/ORR.S44747
- [14] Dostupné z: www.ortopedie-traumatologie.cz.
- [15] KIM, Nam Joong. Microbiologic Diagnosis of Pyogenic Spondylitis. *Infection & Chemotherapy* [online]. 2021, **53**(2), 238. ISSN 2093-2340. Dostupné z: doi:10.3947/ic.2021.0054
- [16] CHEUNG, W. Y. a Keith D. K. LUK. Pyogenic spondylitis. *International Orthopaedics* [online]. 2012, **36**(2), 397–404. ISSN 0341-2695. Dostupné z: doi:10.1007/s00264-011-1384-6
- [17] WASSIF, Reem Khaled, et al. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis. *Drug Delivery* [online]. 2021, **28**(1), 2392–2414. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2021.1998246
- [18] Doplnění souhrnu údajů o přípravku a příbalové informace vankomycinu, Příloha III. *Vancomycin Article 31-1440*. Dostupné z: www.ema.europa.eu/en/documents
- [19] Vancomycin hydrochloride. Dostupné z: www.chemicalbook.com
- [20] HSIEH, Pang-Hsin, Ching-Lung TAI, Po-Chen LEE a Yu-Han CHANG. Liquid Gentamicin and Vancomycin in Bone Cement. *The Journal of Arthroplasty* [online]. 2009, **24**(1), 125–130. ISSN 08835403. Dostupné z: doi:10.1016/j.arth.2008.01.131

- [21] MÜHLBERG, Eric, et al. Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2020, **66**(1), 11–16. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/cjm-2019-0309
- [22] SUCHOPÁR, Josef. *Compendium*. 5. vyd. B.m.: Panax, 2018. ISBN 978-80-902806-7-0.
- [23] SCHEFFERS, Dirk-Jan a Mariana G. PINHO. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2005, **69**(4), 585–607. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005
- [24] RYBAK, Michael J. The Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Vancomycin. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2006, **42**(Supplement_1), S35–S39. ISSN 1537-6591. Dostupné z: doi:10.1086/491712
- [25] GHASEMIYEH, Parisa, et al. Pharmacokinetic assessment of vancomycin in critically ill patients and nephrotoxicity prediction using individualized pharmacokinetic parameters. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2022, **13**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2022.912202
- [26] Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/HVEZDALAEK.htm.
- [27] Gentamicin: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [online]. [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00798>
- [28] Gentamicin | C21H43N5O7 - PubChem [online]. [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gentamicin#section=Color-Form>
- [29] Gentamicin – Wikipedie [online]. [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Gentamicin>
- [30] HANSEN, M., et al. Gentamicin dosing in critically ill patients. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [online]. 2001, **45**(6), 734–740. ISSN 00015172. Dostupné z: doi:10.1034/j.1399-6576.2001.045006734.x
- [31] HODIAMONT, Caspar J., Annemieke K. VAN DEN BROEK, Suzanne L. DE VROOM, Jan M. PRINS, Ron A. A. MATHÔT a Reinier M. VAN HEST. Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin in Various Patient Populations and Consequences for Optimal Dosing for Gram-Negative Infections: An Updated Review. *Clinical*

- Pharmacokinetics* [online]. 2022, **61**(8), 1075–1094. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.1007/s40262-022-01143-0
- [32] HANSEN, Arlen D. Local Antibiotic Delivery Vehicles in the Treatment of Musculoskeletal Infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [online]. 2005, **NA**;(437), 91–96. ISSN 0009-921X. Dostupné z: doi:10.1097/01.blo.0000175713.30506.77
- [33] SVOBODA, Michal; Jiří GALLO, Miroslava MRŇKOVÁ. Antibiotika v kostním cementu. *Klin. Farmakol. a Farm.* 2017, 31.4: 18-24. nedatováno.
- [34] KANELLAKOPOULOU, Kyriaki a Evangelos J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS. Carrier Systems for the Local Delivery of Antibiotics in Bone Infections. *Drugs* [online]. 2000, **59**(6), 1223–1232. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200059060-00003
- [35] EL-HUSSEINY, M., S. PATEL, R. J. MACFARLANE a F. S. HADDAD. Biodegradable antibiotic delivery systems. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* [online]. 2011, **93-B**(2), 151–157. ISSN 0301-620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.93B2.24933
- [36] ANAGNOSTAKOS, Konstantinos a Katrin SCHRÖDER. Antibiotic-Impregnated Bone Grafts in Orthopaedic and Trauma Surgery: A Systematic Review of the Literature. *International Journal of Biomaterials* [online]. 2012, **2012**, 1–9. ISSN 1687-8787. Dostupné z: doi:10.1155/2012/538061
- [37] PAIVA, José C. et al. Biodegradable Bone Implants as a New Hope to Reduce Device-Associated Infections—A Systematic Review. *Bioengineering* [online]. 2022, **9**(8), 409. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering9080409
- [38] Biological evaluation of bioceramic materials--a review. - Free Online Library. Dostupné z: <https://www.thefreelibrary.com/Biological+evaluation+of+bioceramic+materials--a+review.-a0165431733>
- [39] 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. British volume* [online]. 1993, **75-B**(1), 111–114. ISSN 0301-620X. Dostupné z: doi:10.1302/0301-620X.75B1.8380599

- [40] INZANA, Jason A., et al. 3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection. *European Cells and Materials* [online]. 2015, **30**, 232–247. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v030a16
- [41] KALHAPURE, Rahul S., et al. Nanoengineered Drug Delivery Systems for Enhancing Antibiotic Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **104**(3), 872–905. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.24298
- [42] BEREICHEZ-FRIDMAN, Roberto, et al. An intramedullary nail coated with antibiotic and growth factor nanoparticles: An individualized state-of-the-art treatment for chronic osteomyelitis with bone defects. *Medical Hypotheses* [online]. 2017, **105**, 63–68. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2017.06.023
- [43] VAUTHIER, Christine a Kawthar BOUCHEMAL. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* [online]. 2009, **26**(5), 1025–1058. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-008-9800-3
- [44] *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review | Request PDF* [online]. [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/279545193_Different_techniques_for_preparation_of_polymeric_nanoparticles-_A_review
- [45] INZANA, Jason A., Edward M. SCHWARZ, Stephen L. KATES a Hani A. AWAD. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials* [online]. 2016, **81**, 58–71. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.012
- [46] ZENG, Zhaowu. Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2010, 1057. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S14912
- [47] DANAFAR, Hossein. MPEG–PCL copolymeric nanoparticles in drug delivery systems. *Cogent Medicine* [online]. 2016, **3**(1), 1142411. ISSN 2331-205X. Dostupné z: doi:10.1080/2331205X.2016.1142411
- [48] SHARMA, Shweta, Ankush PARMAR, Shivpoojan KORI a Rajat SANDHIR. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **80**, 30–40. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.06.014

- [49] ALMOUSTAFA, Hassan A., Mohammed A. ALSHAWSH a Zamri CHIK. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **533**(1), 275–284. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.054
- [50] *Liposome Nanoparticle | Liposome Monitoring* [online]. [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: <https://www.inprocess-lsp.com/liposomes/>
- [51] KUMAR, Raj, Ashutosh SINGH a Neha GARG. Acoustic Cavitation-Assisted Formulation of Solid Lipid Nanoparticles using Different Stabilizers. *ACS Omega* [online]. 2019, **4**(8), 13360–13370. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b01532
- [52] NASERI, Neda, Hadi VALIZADEH a Parvin ZAKERI-MILANI. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2015, **5**(3), 305–313. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.15171/apb.2015.043
- [53] KANWAR, Rohini, Jyoti RATHEE, Deepak B. SALUNKE a Surinder K. MEHTA. Green Nanotechnology-Driven Drug Delivery Assemblies. *ACS Omega* [online]. 2019, **4**(5), 8804–8815. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b00304
- [54] MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, **47**(2–3), 165–196. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00105-3
- [55] MIRCHANDANI, Yashika, Vandana B. PATRAVALE a Brijesh S. Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release* [online]. 2021, **335**, 457–464. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2021.05.032
- [56] MALLER, R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery €“ a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2000, **50**(1), 161–177. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00087-4
- [57] SHAH, P, D BHALODIA a P SHELAT. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy* [online]. 2010, **1**(1), 24. ISSN 0975-8453. Dostupné z: doi:10.4103/0975-8453.59509

- [58] ANTON, Nicolas a Thierry F. VANDAMME. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research* [online]. 2011, **28**(5), 978–985. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-010-0309-1
- [59] SALVIA-TRUJILLO, Laura, et al. Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology* [online]. 2017, **8**(1), 439–466. ISSN 1941-1413. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-food-030216-025908
- [60] ANTON, Nicolas a Thierry F. VANDAMME. The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2009, **377**(1–2), 142–147. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.014
- [61] THIPPARABOINA, Rajesh, et al. Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **135**, 291–308. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.07.046
- [62] RYAN, Anthony J., Shao-Min MAI, J. Patrick A. FAIRCLOUGH a Ian W. HAMLEY. Structures of amphiphilic block copolymers in their liquid and solid states. In: *Amphiphilic Block Copolymers* [online]. B.m.: Elsevier, 2000, s. 151–167. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044482441-7/50008-6
- [63] PERUMAL, Suguna, Raji ATCHUDAN a Wonmok LEE. A Review of Polymeric Micelles and Their Applications. *Polymers* [online]. 2022, **14**(12), 2510. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14122510
- [64] JHAVERI, Aditi M. a Vladimir P. TORCHILIN. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2014, **5**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2014.00077
- [65] YOKOYAMA, Masayuki. Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2010, **7**(2), 145–158. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425240903436479
- [66] AGRAWAL, YK a VishalR PATEL. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* [online]. 2011, **2**(2), 81. ISSN 2231-4040. Dostupné z: doi:10.4103/2231-4040.82950

- [67] ŠKOLÁKOVÁ, T. a P. ZÁMOSTNÝ. Techniky mletí a společného mletí jako přístupy ke zvýšení rychlosti rozpouštění špatně rozpustných léčiv. *Chemické listy*. 2020, 114(9), 591–601
- [68] JACOB, Shery, Anroop B. NAIR a Jigar SHAH. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems. *Biomaterials Research* [online]. 2020, 24(1), 3. ISSN 2055-7124. Dostupné z: doi:10.1186/s40824-020-0184-8
- [69] GEETHA, G.; POOJITHA, U.; KHAN, K. Arshad Ahmed. Various techniques for preparation of nanosuspension-A Review. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2014, 3.9: 30-37. nedatováno.
- [70] WANG, Yancai, Ying ZHENG, Ling ZHANG, Qiwei WANG a Dianrui ZHANG. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, 172(3), 1126–1141. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2013.08.006
- [71] TRENKENSCHUH, Eduard a Wolfgang FRIESS. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2021, 165, 345–360. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2021.05.024
- [72] ASTETE, Carlos E. a Cristina M. SABLIOV. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2006, 17(3), 247–289. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856206775997322
- [73] COHEN-SELA, Einat, et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* [online]. 2009, 133(2), 90–95. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.09.073
- [74] WANG, Yichao, Puwang LI, Thao TRUONG-DINH TRAN, Juan ZHANG a Lingxue KONG. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials* [online]. 2016, 6(2), 26. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano6020026
- [75] VYSLOUŽIL, JAKUB, et al. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*, 2013, 107(1), 16-23.

- [76] REIS, Catarina Pinto, et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2006, **2**(1), 8–21. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- [77] ZIELIŃSKA, Aleksandra, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* [online]. 2020, **25**(16), 3731. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731
- [78] PERES, Luana Becker, et al. Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **140**, 317–323. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.033
- [79] JENJOB, Ratchapol, Treethip PHAKKEEREE, Farzad SEIDI, Man THEERASILP a Daniel CRESPIY. Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2019, **19**(6), 1900063. ISSN 1616-5187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201900063
- [80] VANDERVOORT, J a A LUDWIG. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2002, **238**(1–2), 77–92. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(02)00058-3
- [81] SAWANT, Anali, et al. Solid-in-Oil-in-Water Emulsion: An Innovative Paradigm to Improve Drug Stability and Biological Activity. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2021, **22**(5), 199. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-021-02074-y
- [82] BARICHELLO, Jose Mario, et al. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 1999, **25**(4), 471–476. ISSN 0363-9045. Dostupné z: doi:10.1081/DDC-100102197
- [83] MUTHU, MS. Nanoparticles based on PLGA and its co- \square polymer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)* [online]. 2009, **3**(4) [vid. 2023-04-26]. ISSN 1998-409X. Dostupné z: doi:10.22377/AJP.V3I4.276
- [84] PATIL, S. S. a R. D. K. MISRA. The significance of macromolecular architecture in governing structure-property relationship for biomaterial applications: an overview.

- Materials Technology* [online]. 2018, **33**(5), 364–386. ISSN 1066-7857. Dostupné z: doi:10.1080/10667857.2018.1447266
- [85] XIE, Jingwei a Chi-Hwa WANG. Self-Assembled Biodegradable Nanoparticles Developed by Direct Dialysis for the Delivery of Paclitaxel. *Pharmaceutical Research* [online]. 2005, **22**(12), 2079–2090. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-005-7782-y
- [86] RAMOHLOLA, Kabelo E., Emmanuel I. IWUOHA, Mpitloane J. HATO a Kwena D. MODIBANE. Instrumental Techniques for Characterization of Molybdenum Disulphide Nanostructures. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2020, **2020**, 1–29. ISSN 2090-8873. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8896698
- [87] LIN, Ping-Chang, Stephen LIN, Paul C. WANG a Rajagopalan SRIDHAR. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, **32**(4), 711–726. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.006
- [88] KASZUBA, Michael, et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2008, **10**(5), 823–829. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-007-9317-4
- [89] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*, 2014, 108(5), 479-482.
- [90] YOUSRY, Carol, et al. Studying the influence of formulation and process variables on Vancomycin-loaded polymeric nanoparticles as potential carrier for enhanced ophthalmic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2017, **100**, 142–154. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2017.01.013
- [91] DANAEI, M., et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2), 57. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [92] SMITH, Mackensie C., Rachael M. CRIST, Jeffrey D. CLOGSTON a Scott E. MCNEIL. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, **409**(24), 5779–5787. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-017-0527-z

- [93] CLOGSTON, Jeffrey D. a Anil K. PATRI. Zeta Potential Measurement. In: [online]. 2011, s. 63–70. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6
- [94] LEYVA-PORRAS, César, et al. Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries. *Polymers* [online]. 2019, **12**(1), 5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12010005
- [95] FORNAGUERA, Cristina a Conxita SOLANS. Analytical Methods to Characterize and Purify Polymeric Nanoparticles. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2018, **2018**, 1–10. ISSN 1687-9422. Dostupné z: doi:10.1155/2018/6387826
- [96] HÖHNE, G. W. H., W. HEMMINGER a H.-J. FLAMMERSHEIM. Differential Scanning Calorimetry [online]. 1996 [vid. 2023-04-26]. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-662-03302-9
- [97] LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1996, **138**(1), 1–12. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(96)04486-9
- [98] SNEJDROVA, Eva, Stepan PODZIMEK, Juraj MARTISKA, Ondrej HOLAS a Milan DITTRICH. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2020, **70**(1), 63–75. ISSN 1846-9558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2020-0011
- [99] SNEJDROVA, Eva, et al. Rifampicin-loaded PLGA nanoparticles for local treatment of musculoskeletal infections: Formulation and characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2022, **73**, 103435. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2022.103435
- [100] RAMAZANI, Farshad, et al. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **499**(1–2), 358–367. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.020
- [101] LAI, Patrick, Weiam DAEAR, Raimar LÖBENBERG a Elmar J. PRENNER. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and*

- Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, **118**, 154–163. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.03.017
- [102] ZAKERI-MILANI, Parvin, Badir Delf LOVEYMI, Mitra JELVEHGARI a Hadi VALIZADEH. The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2013, **103**, 174–181. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.021
- [103] FORNAGUERA, Cristina a Conxita SOLANS. Characterization of Polymeric Nanoparticle Dispersions for Biomedical Applications: Size, Surface Charge and Stability. *Pharmaceutical Nanotechnology* [online]. 2018, **6**(3), 147–164. ISSN 22117385. Dostupné z: doi:10.2174/2211738506666180706121515
- [104] MADANI, Fatemeh, et al. Investigation of Effective Parameters on Size of Paclitaxel Loaded PLGA Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2018, **8**(1), 77–84. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.15171/apb.2018.010
- [105] CORRIGAN, Owen I. a Xue LI. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **37**(3–4), 477–485. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2009.04.004
- [106] KITA, Katarzyna a Christian DITTRICH. Drug delivery vehicles with improved encapsulation efficiency: taking advantage of specific drug–carrier interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2011, **8**(3), 329–342. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2011.553216
- [107] DANESHMAND, Sara, et al. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2018, **119**(6), 4251–4264. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.26617
- [108] MASSELLA, Daniele, et al. Overcoming the Limits of Flash Nanoprecipitation: Effective Loading of Hydrophilic Drug into Polymeric Nanoparticles with Controlled Structure. *Polymers* [online]. 2018, **10**(10), 1092. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10101092
- [109] SOUILLAC, Pierre a J. H RYTTING. Characterization of delivery systems, differential scanning calorimetry. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, 1999, 1: 212-227.

- [110] LUND, W. Good manufacturing practices. The pharmaceutical codex: principle and practice of pharmaceutics. London. 1994.
- [111] XIE, Hui a Jeffrey W SMITH. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2010, **8**(1), 18. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/1477-3155-8-18
- [112] ORTIZ DE SOLORZANO, Isabel, et al. Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: effect of passive mixing. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016, Volume 11, 3397–3416. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S108812
- [113] SNEHALATHA, Movva, Kolachina VENUGOPAL a Ranendra N. SAHA. Etoposide-Loaded PLGA and PCL Nanoparticles I: Preparation and Effect of Formulation Variables. *Drug Delivery* [online]. 2008, **15**(5), 267–275. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717540802174662
- [114] SIEGEL, Steven J., et al. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 64.3: 287-293.
- [115] SCOTT, Christopher, ABDELGHANY, QUINN, INGRAM, GILMORE, DONNELLY a TAGGART. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2012, 4053. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S34341