

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra KFT

Studijní program: Farmacie

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2023

Autor/ka práce: **Ivana Petrášová**

Vedoucí práce: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Konzultant/ka: Mgr. Vladislav Frolov

Oponent/ka: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

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

Rozsah práce: 68 stran, 23 obrázků, 11 tabulek, 115 citací

**Hodnocení práce:**

- |  |             |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části:               | výborná     |
| b) Náročnost použitých metod:                                  | výborná     |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):   | dobré       |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat:                     | dobrá       |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):          | velmi dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:              | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | dobrá       |
| i) Splnění cílů práce:   | velmi dobré |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | výborné     |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | výborná     |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | výborná     |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Diplomová práce Ivany Petrášové se zabývá přípravou a hodnocením PLGA nanočástic s vankomycinem. Téma je aktuální a pro léčbu muskuloskeletálních infekcí je jistě přínosem. Teoretická část práce je přehledně sepsaná a odkazuje se na množství aktuálních literárních zdrojů. V textu se vyskytuje minimum pravopisných nebo stylistických chyb.

Velké výhrady mám však k experimentální části práci, viz níže.

Dotazy a připomínky:

- Prohlášení a poděkování se obvykle píše zvlášť a v prohlášení chybí věta, že Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Je nutná oprava formou „Errat“.

- Zkratky VAN a ZP jsou vysvětleny jen v seznamu literatury, ne v textu. Vysvětlení zkratky Cs chybí.

- Na str. 21 autorka píše, že organická fáze (O) je emulgována do kontinuální vodné fáze (V) „obsahující tenzid (např. polyvinylacetát; PVA), aby výsledná emulze O/V byla stabilní. Na str. 24 je stejná zkratka použita zcela v jiné souvislosti: „neiontový polyvinylalkohol (PVA)“.

- Mezi číselnou hodnotu a jednotku se obvykle vkládá pevná mezera.

- Nejistota se omezuje na jedinou platnou číslici a výsledek se přizpůsobuje takto upravené nejistotě, v tab. 6, 7 a 8 je zápis nelogický a nesprávný!

- Dílčí hodnoty uvedené v tab. 7 by měly mít stejný počet desetinných míst, předpokládám, že byly měřeny se stejnou přesností.

- Jednotka se neuvádí v hranatých závorkách, do těch se uzavírá symbol veličiny a označuje se tak její rozměr.

K experimentální části práce mám řadu připomínek a výhrad, které shrnuji dále:

- Ze snímků ze SEM vyvozujete, že částice byly sférické, avšak na snímcích, které navíc nejsou příliš ostré, lze pozorovat jen nějaké shluky o nejasných tvarech. Dále píšete, že softwarově byla potvrzena velikost zjištěná pomocí Zetasizeru, ale neuvádíte, jakým SW, ani konkrétní výsledky tohoto měření. Z měřítka vloženého ve snímku se mi nezdá, že by velikost částic odpovídala velikosti zjištěné Zetasizerem. V návaznosti považuji za chybné tvrzení na str. 52, že byla ověřena morfologie studovaných nanočástic. Ve skutečnosti pro přípravu nanočástic byly použity zcela jiné koncentrace PLGA, PVA a dichlormethanu než pro vzorek prezentovaný na SEM. Pomocí SEM tedy byla hodnocena morfologie a velikost jiných částic než těch, se kterými bylo pracováno.

- Ve slepém vzorku při měření absorbance je obsaženo 2 % PVA (str. 34), ale 2% koncentrace PVA je koncentrací pouze organické fáze, při přepočtu na celkový objem disperze bude nižší, navíc vzorky pro nepřímé stanovení byly ještě před měřením dále ředěny, a tedy koncentrace PVA dále klesla. Bylo by vhodné množství PVA ve slepém vzorku tedy při experimentu upravit.

- Na str. 35 píšete, že byl teplotní režim vyhledaný v literatuře, ale zdroj chybí.

- V seznamu materiálů není uvedeno, jestli se jedná o vankomycin-hydrochlorid, pouze v popisku obr. 13.

- V tab. 6 jsou uvedeny výsledky měření velikosti pro nanočástice s 0,5, 1, 2 a 4 % PLGA, jejich příprava však není uvedena v metodice. Naopak v tabulce 1 v metodice je seznam připravených vzorků, které ale hodnoceny nebyly. Tato okolnost by měla být vysvětlena a opravena.

- Podobně za faktickou chybu považuji to, že v tab. 7 jsou shrnuty výsledky měření velikosti nanočástic v závislosti na koncentraci vankomycinu, které v metodice nejsou uvedeny. Stejně tak nikde není uvedeno a zdůvodněno, proč byla vybrána a hodnocena koncentrace PVA 2 %, když se v metodice uvádí celá řada dalších koncentrací PVA.

- Stejně tak není jasné, proč byly vybrány jen koncentrace 5 mg vankomycinu a 3,3 % PLGA (tab. 6 a 8) a nebyly naopak měřeny vzorky o dalších koncentracích uvedených v metodice.

- V tab. 6, 7 a 8 variujete množství PLGA, vankomycinu a PVA, aby mohl být hodnocen vliv těchto sloučenin na velikost nanočástic. Není jasné, jak lze hodnotit tři experimentálně se měnící parametry, jejichž kombinace není nikdy porovnatelná. Myslím, že by měly být koncentrace, které jsou zvoleny pevně (třetí se mění), vybrány z řady již testovaných koncentrací. Tedy ve dvou parametrech by se měly připravené nanočástice překrývat, aby byly srovnatelné.

- Tab. 11 a–c: Množství vankomycinu uvolněného z PLGA/T nanočástic uvádí zjevně 3 opakování téhož pokusu, které je možné shrnout do jedné tabulky s uvedením průměru a odchylky. Nejedná se o disoluci provedenou třikrát, jak by se mohlo zdát, ale pouze jednou, kdy byla tři měření jednoho vzorku (na spektrofotometru) nepochopitelně rozdělena do tří tabulek.

- Na str. 47 tvrdíte, že „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“. Jednak se zde vyskytuje zvláštní formulace, že smykové napětí homogenizuje disperzi, a jednak pro tato tvrzení zde není zdroj.

- V tab. č. 1 je uvedeno 6 různých koncentrací PVA a PLGA použitých při přípravě nanočástic, ale v textu na stejné straně (str. 31) výše je uvedeno jen 5 koncentrací. Není uvedeno množství vody použité pro přípravu vodné fáze, a tedy nelze z ničeho vyvodit jaká max. koncentrace PVA byla při přípravě použita. Vhodnější by bylo také koncentrace PVA a PLGA uvádět jako jejich finální koncentrace v disperzi, nikoli ve vodné či org. fázi při přípravě disperze.

- Jako jednu z nejzávažnějších problémů této práce považuji srovnávání přímého a nepřímého stanovení EE, jelikož nanočástice pro přímé a nepřímé stanovení měly zcela jiné složení a nelze tedy výsledky porovnat. Pokud bychom i přes to výsledky porovnali, alespoň na základě stejných sloučenin použitých při přípravě, pak zde není nikde navrženo vysvětlení tak velkého řádového rozdílu mezi stanovením EE přímo (0,7–4,4 %) a nepřímo (37,7–50,9 %). Pouze uvádíte, že rozdíl byl také pozorován v jiné publikaci (č. 108), avšak tam byl max. rozdíl mezi stanoveními cca 4 %.

- U PVA není uvedena jeho molekulová hmotnost a stupeň hydrolyzy, tedy parametry důležité např. pro představu o rozpustnosti nebo průchodu přes membránu při dialýze.

- Zcela chybí slovní popis výsledků, jsou jen v tabulkové a grafické podobě a pak rovnou diskutovány.

Připomínky a výhrady mám také k závěrům práce:

- V závěru nepřesně uvádíte, že byla velikost nanočástic měřena spektrofotometricky, přičemž byly měřeny na Zetasizeru, který je založený na rozptylu záření, nikoliv na absorbanci.

- V závěru píšete, že byl studován vliv PLGA na velikost, ale závěr z tohoto hodnocení zde neděláte.

- Jako jeden ze závěrů měření EE je vyvozeno, že je ovlivněna koncentrací PVA. Avšak tento vliv byl vyvozen pouze z porovnání dvou vzorků a tento experiment navíc nebyl opakován! Může se tedy snadno jednat o náhodnou chybu. (Vycházím z obrázku č. 22, kde vzhledem k variabilním koncentracím PLGA, PVA a dvěma rozdílným způsobům stanovení lze mezi sebou v tomto případě porovnat pouze 2. a 3. vzorek zleva).

- V abstraktu ani v závěru není zmínka o výsledku přímého stanovení EE. Rovněž nikde není uvedeno, kolik vankomycinu se použilo při stanovení EE nepřímo.

Otázky:

- Proč bylo použito tak vysoké množství PVA? Podle čeho byl volen poměr mezi PLGA a PVA, zdá se být nahodilý.

- Jak si vysvětlujete rostoucí velikost nanočástic s rostoucí koncentrací PVA?

- Je nějaká cílová nebo optimální velikost nanočástic pro zamýšlené účely jejich použití?

- Na str. 34 uvádíte, že byl odvozen objem supernatantu – jak?

- Jak si vysvětlujete nízkou hodnotu EE při přímém stanovení?

- Můžete blíže vysvětlit průběh centrifugace při přímé metodě (tab. 5)? Nerozumím, jaké kroky byly použity mezi jednotlivými centrifugacemi o daných rpm, a proč některé vzorky byly centrifugovány při 4 různých rpm a jiné při jediné hodnotě rpm.

- Proč byl v průběhu centrifugace promýván pouze vzorek s 1 % PVA? Ostatní nemusely být promývány?
- Kolik vankomycinu bylo použito při disoluci? Jaká byla EE v tomto případě? Byla EE určována? Pokud ne, jak víte kolik bylo 100 % vankomycinu?
- Můžete vysvětlit, jak byly vypočítány hodnoty ve 4. sloupci tabulky 11 (vankomycin (mg))?
- Opravdu se 3 % PVA (nebo i vyšší, nelze z metodiky říct) rozpustila za 1 h při 50 °C (str. 31)?
- Proč byla disoluce prováděna při pH 7,4? Nemá zánětlivá tkáň při těchto infekcích pH nižší?
- Nedochozí u vankomycinu při pH 7,4 už k rozkladu?
- DSC PLGA (obr. 14) se myslí PLGA jako takového nebo po formulaci do nanočástic?
- Proč u DSC PLGA nanočástic (obr. 15) není vidět krystalizace a tání vody? Nebo byly částice nejprve vysušeny (není uvedeno v metodice)?
- Na str. 48 uvádíte, že snímky SEM potvrdily stabilitu nanočástic. Jak je to myšleno (stabilita v čase, agregační stabilita)? Vzhledem k viditelným shlukům, byla opravdu stabilita potvrzena?

S ohledem na množství připomínek a věcných chyb požaduji odpovědi k jednotlivým bodům písemně a k práci sepsat errata.

**hodnocení, práce je: dobrá**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

26. května 2023

podpis oponenta/ky