

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické technologie



**Hydrofobní iontové párování jako strategie pro zlepšení  
enkapsulační účinnosti PLGA nanočástic**

**Hydrophobic ion pairing as a strategy to improve  
the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hradec Králové 2024

Lizaveta Laviaha

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, 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.

V Hradci Králové 30.4.2024

Lizaveta Laviaha

# 1 OBSAH

1	Obsah .....	3
2	Abstrakt.....	5
3	Abstract.....	6
4	Zadání .....	7
5	Úvod.....	9
6	Seznam zkratk .....	10
7	Teoretická část .....	12
7.1	Muskuloskeletální infekce.....	12
7.1.1	Léčba muskuloskeletálních infekcí.....	12
7.2	Terapeutické systémy pro léčbu muskuloskeletálních infekcí.....	14
7.2.1	Kostní cement s antibiotickou náplní (ABLC) .....	15
7.2.2	Kostní štěpy a jejich náhrady .....	15
7.2.3	Polymery .....	16
7.2.4	Částicové systémy pro léčbu muskuloskeletálních infekcí.....	16
7.3	Metody přípravy PLGA nanočástic.....	18
7.3.1	Metoda jednoduché emulgace.....	19
7.3.2	Dvojitě-emulzní metoda.....	19
7.3.3	Suspenzně-emulzní metoda .....	20
7.3.4	Metoda nanoprecipitace .....	21
7.3.5	Metoda vysolování.....	21
7.4	Hydrofobní iontové párování .....	22
7.4.1	Enkapsulace hydrofobních komplexu do PLGA částic .....	24
7.5	Hodnocení nanočástic .....	25
7.5.1	Stanovení velikosti.....	25
7.5.2	Hodnocení stability a stanovení povrchového náboje .....	26
7.5.3	Stanovení tvaru .....	27

7.5.4	Stanovení EE a LC v nanočásticích .....	27
8	Experimentální část.....	29
8.1	Přístroje .....	29
8.2	Pomůcky.....	29
8.3	Chemické sloučeniny .....	29
8.4	Příprava nanočástic .....	31
8.4.1	Příprava nanočástic dvojitě emulzní metodou .....	31
8.4.2	Příprava nanočástic jednoduchou emulgací.....	32
8.4.3	Příprava nanočástic suspenzně-emulzní metodou .....	33
8.5	Měření velikosti, polydisperzity a zeta-potenciálu nanočástic.....	33
8.6	HPLC stanovení VAN a VAN-AOT.....	34
8.7	Spektrofotometrické stanovení GEN a GEN-AOT.....	35
8.8	Stanovení EE a LC v nanočásticích .....	36
8.8.1	VAN a GEN.....	36
8.8.2	VAN-AOT a GEN-AOT.....	37
8.8.3	Výpočet.....	37
8.9	SEM.....	38
9	Výsledky .....	39
9.1	Charakteristiky PLGA nanočástic.....	39
9.2	EE a LC PLGA nanočástic.....	43
10	Diskuze .....	45
10.1	Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic .....	46
10.2	Enkapsulační účinnost a procentuální podíl léčiva v nanočásticích.....	48
10.3	SEM.....	53
11	Závěr .....	54
12	Literatura.....	55

## 2 ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Lizaveta Laviaha

Název práce: Hydrofobní iontové párování jako strategie pro zlepšení enkapsulační účinnosti PLGA nanočástic.

Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Vladislav Frolov

Cílem diplomové práce bylo zvýšit enkapsulační účinnost (EE) a kapacitu PLGA nanočástic (NČ) pro hydrofilní antibiotika gentamicin (GEN) a vankomycin (VAN). Byla zvolena metoda hydrofobního iontového párování (HIP) a dokusát sodná sůl ve funkci anionického tenzidu (AOT). Byly připraveny PLGA nanočástice inkorporované VAN nebo GEN nebo jejich komplexy s AOT optimalizovanými metodami. Nanočástice s VAN a GEN byly připraveny dvojitě-emulzní metodou ( $V_1/O/V_2$ ), pro GEN-AOT byla použita metoda jednoduché emulgace (O/V) a nanočástice s VAN-AOT byly připraveny suspenzně-emulzní metodou (S/O/V). Byly získány stabilní NČ o velikosti 108 až 223 nm s polydisperzitou nižší než 0,2. Byl zjištěn vliv koncentrace PLGA na velikost NČ. Nízký zeta potenciál nanočástic souvisí se sterickou stabilizací neionogenním stabilizátorem Poloxamer 407. Snímky SEM potvrdily sférický tvar NČ. Enkapsulační účinnost a kapacita polymeru pro léčivo (LC) byly stanoveny přímou metodou. VAN a jeho komplex byly analyzovány pomocí HPLC, GEN a jeho komplex spektrofotometricky. Enkapsulační účinnost VAN a GEN byla zvýšena hydrofobním iontovým párováním, avšak nejvyšší hodnota pro VAN-AOT byla pouze 14 % ve srovnání s GEN-AOT, kde EE dosáhla až 90 %. V dalších experimentech bude nutné se zaměřit na nízkou enkapsulační účinnost VAN-AOT, například použitím jiného surfaktantu nebo jiné metody přípravy NČ.

**Klíčová slova:** polymerní nanočástice, PLGA, vankomycin, gentamicin, hydrofobní iontové párování, dokusát sodná sůl.

### 3 ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Lizaveta Laviaha

Title of thesis: Hydrophobic ion pairing as a strategy to improve the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles.

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Vladislav Frolov

The aim of this thesis was to increase the encapsulation efficiency (EE) and capacity of PLGA nanoparticles (NPs) for the hydrophilic antibiotics gentamicin (GEN) and vancomycin (VAN). The method of hydrophobic ion pairing (HIP) and docusate sodium as anionic surfactant (AOT) were chosen. PLGA nanoparticles loaded with VAN or GEN, or their AOT complexes were prepared with optimized methods. Nanoparticles with VAN and GEN were prepared by the double-emulsion method ( $W_1/O/W_2$ ), for GEN-AOT the single emulsion method (O/W) was used, and nanoparticles with VAN-AOT were prepared by suspension-emulsion method (S/O/W). Stable NPs with a size of 108 to 223 nm with a polydispersity lower than 0.2 were obtained. The influence of PLGA concentration on the size of NPs was found. The low zeta potential of the nanoparticles was related to steric stabilization by the non-ionogenic stabilizer Poloxamer 407. SEM images confirmed the spherical shape of the NPs. Encapsulation efficiency and loading capacity (LC) were determined by direct method. VAN and its complex were analysed by HPLC, GEN and its complex by spectrophotometry. The EE of VAN and GEN was increased by hydrophobic ion pairing, however, the highest EE value of VAN-AOT was only 14 % compared to GEN-AOT, where EE reached up to 90 %. In further experiments, it would be appropriate to focus on the low encapsulation efficiency of VAN-AOT, for example, by using a different surfactant or a different method of preparation of the NPs.

**Key words:** polymeric nanoparticles, PLGA, vancomycin, gentamicin, hydrophobic ion pairing, docusate sodium.

## 4 ZADÁNÍ

Cílem diplomové práce bylo zvýšit enkapsulační účinnost a kapacitu PLGA nanočástic pro hydrofilní antibiotika — gentamicin a vankomycin.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Metodou hydrofobního iontového párování (HIP) připravit komplexy vankomycin hydrochloridu (VAN) a gentamicin sulfátu (GEN) s anionickým surfaktantem dokusát sodnou soli (AOT).
2. Formulovat PLGA nanočástice enkapsulované VAN, GEN a jejich hydrofobními komplexy optimálními metodami dle charakteru daného léčiva.
3. Charakterizovat velikost, zeta potenciál a polydisperzitu nanočástic metodou dynamického rozptylu světla (DLS).
4. Stanovit enkapsulační účinnost a kapacitu PLGA pro inkorporaci léčiv přímou metodou s využitím HPLC analýzy nebo spektrofotometrie.
5. Zhodnotit vliv formulačních faktorů na charakteristiky nanočástic, enkapsulační účinnost a kapacitu PLGA pro inkorporaci léčiv.

UNIVERZITA KARLOVA  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: **Lizaveta Laviaha**

Studijní program: **Farmacie**

Studijní obor: **Farmacie**

Děkan fakulty Vám podle zákona č. 111/1998 Sb. určuje tuto diplomovou práci:

Název práce: **Hydrofobní iontové párování jako strategie pro zlepšení enkapsulační účinnosti PLGA nanočástic.**

Anglický název práce: **Hydrophobic ion pairing as a strategy to improve the encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles.**

Zásady pro vypracování:

1. Literární rešerše. 2. Provedení experimentu. 3. Vyhodnocení a zpracování výsledků. 4. Prezentace výsledků na SVK. 5. Vytvoření spisu diplomové práce. 6. Příprava prezentace k obhajobě.

Seznam odborné literatury:

Vědecké články dostupné v databázích a odborných časopisech (po roce 2000) dle zadaných klíčových slov.

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

Oponenti:

Konzultanti: **Frolov Vladislav**

Datum zadání diplomové práce: 21.2.2024

Termín odevzdání diplomové práce: dle harmonogramu příslušného akademického roku



Vedoucí katedry



Děkan

V Hr. Králové 21.2.2024



## 5 ÚVOD

Muskuloskeletální infekce (MI) jsou v závažným zdravotním problémem. Současná léčba ve většině případů spočívá v systémovém podávání antibiotik, což s sebou nese problém antibiotické rezistence. Taková léčba navíc nezaručuje úplné vyléčení MI z důvodu nízké dostupnosti antibiotika v místě infekce. Proto se systémová léčba kombinuje s lokální aplikací antimikrobiálních látek inkorporovaných do speciálních nosičů. Metodou volby pro léčbu MI je v současnosti implantace kostního cementu s antibiotickou náplní (ABLC). Lokální podávání léčiv vede ke snížení rizika vzniku vážných nežádoucích účinků, sníží celkovou zátěž organismu a riziko rozvoje antibiotické rezistence. Pro lokální podávání antibiotik lze využít řadu polymerních nosičů a formulovat terapeutické systémy ve formě nanočástic, které zajistí prodloužené uvolňování antibiotik a sníží jejich toxicitu.

Pro léčbu MI se používají především vysoce hydrofilní antibiotika jako vankomycin hydrochlorid a gentamicin sulfát. Velká hydrofilita těchto látek vede k jejich úniku z nanočástic tvořených hydrofobním polymerem, a tím i k nízké enkapsulaci a velmi rychlému uvolňování léčiva z nosiče. Pro překonání těchto problémů se velmi slibnou jeví metoda hydrofobního iontového párování (HIP) hydrofilních antibiotik s anionickým surfaktantem, což by mělo vést ke zvýšení enkapsulační účinnosti a prodlouženému uvolňování antibiotik z nanočástic. Tato metoda je zadáním předložené diplomové práce. Prezentovaná studie metodicky navazuje na již realizované práce zaměřené na přípravu a hodnocení PLGA nanočástic s antibiotiky.<sup>1,2,3</sup>

## 6 SEZNAM ZKRATEK

ABLC	kostní cement s antibiotickou náplní
AOT	dokusát sodná sůl
DBM	demineralizovaná kostní matrix
DCM	dichlormethan
DLS	dynamický rozptyl světla
EE	enkapsulační účinnost
GA	kyselina glykolová
GEN	gentamicin sulfát
GEN-AOT	komplex gentamicinu se surfaktantem AOT
HIP	hydrofobní iontové párování
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LA	kyselina mléčná
LC	loading capacity (množství léčiva v NČ; kapacita polymeru pro léčivo)
MI	muskuloskeletární infekce
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Stafylococcus aureus</i>
NČ	nanočástice
OPA	o-oftaldialdehydový reagent
PCL	poly( $\epsilon$ -kaprolakton)
PCS	fotonová korelační spektroskopie
PDI	index polydisperzity
PEG	polyethylenglykol
PGA	kyselina polyglykolová

PLA	kyselina polylactonová
PLGA-A2	kyselina poly(lactonová- <i>ko</i> -glykolová) větvená na polyakrylátu
RES	retikuloendoteliální systém
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLN	pevné lipidové nanočástice
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
VAN	vankomycin hydrochlorid
VAN-AOT	komplex vankomycinu se surfaktantem AOT
ZP	zeta potenciál

## 7 TEORETICKÁ ČÁST

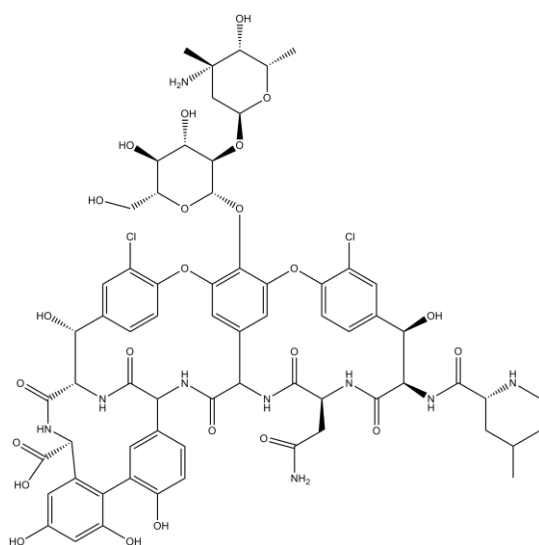
### 7.1 Muskuloskeletální infekce

Muskuloskeletálními infekcemi se rozumí napadení svalů, kostí nebo kloubů choroboplodnými organismy, jejich množení a reakce tělesných tkání na tyto organismy a toxiny, které produkují. Muskuloskeletální infekce se rozlišují na typické, jejichž původcem je *Staphylococcus aureus*, nebo atypické, které jsou vyvolány některými druhy mykobakterií nebo hub.<sup>5</sup> Infekce se dostává do organismu třemi způsoby: hematogenní cestou, přímou implantací nebo souvislé šíření. Hematogenní šíření je nejčastější příčinou muskuloskeletálních infekcí ve všech oblastech těla, včetně páteře. Přímá implantace je poměrně běžná v různých oblastech těla v důsledku otevřených operací a perkutánních výkonů. Souvislé šíření je charakterizováno přenosem infekce přes kůži nebo ze sousedních tkání.<sup>4,5</sup> Zvýšené riziko výskytu muskuloskeletálních infekcí u dospělých jedinců je spojeno s rizikovými faktory jako je vyšší věk, diabetes mellitus, revmatoidní artritida, ortopedické operace, kožní infekce a injekční užívání drog.<sup>6</sup> Diagnostika infekce může být klinicky i časově náročná. V některých případech může trvat rok nebo i déle, než se dospěje ke konečné diagnóze.<sup>4,7</sup> Nesprávná nebo opožděná diagnóza může vést k destrukci kostí nebo kloubů, trvalé invaliditě a špatné kvalitě života.<sup>7</sup>

#### 7.1.1 Léčba muskuloskeletálních infekcí

Základem léčby muskuloskeletálních infekcí je správný výběr léčivé látky a její podání v dostatečných koncentracích.<sup>8</sup> V případě nemožnosti identifikace patogenu je využita empirická terapie. Antibiotická terapie bývá dlouhodobá a zaměřuje se na identifikaci původce, stanovení citlivosti ke zvolené antibiotické látce a stanovení baktericidních hladin. Optimální délka antibiotické léčby není přesně definována. Moderní medicína a vývoj léčebných protokolů v dnešní době umožňují zkrátit dobu léčby, ale antibiotická terapie kratší, než čtyři týdny může vést k vysoké míře recidivy. Léčba perorálními antibiotiky je indikována obvykle po dobu tří měsíců.<sup>9</sup> Antibiotika používána pro léčbu MI by měla mít vysokou biologickou dostupnost, dobrý průnik do kostí a dlouhý eliminační poločas.<sup>9,10</sup> I přes svůj nezpochybnitelný přínos má dlouhodobá antibiotická léčba své nevýhody, jako je antibiotická rezistence a zvýšené riziko nežádoucích účinků, což vede někdy i k úmrtí a rovněž k vyšším nákladům na zdravotní péči.<sup>11,12</sup> Často používanými antibiotiky v léčbě MI jsou vankomycin a gentamycin.<sup>8</sup>

## Vankomycin



Registrační číslo CAS: 1404-90-6

Molární hmotnost: 1449,2 g/mol

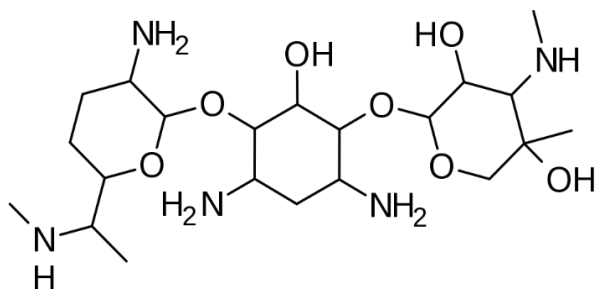
Vazba na bílkoviny: 10–50 %<sup>13</sup>

Sumární vzorec: C<sub>66</sub>H<sub>75</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O<sub>24</sub>

Obr. 1: Strukturální vzorec vankomycinu<sup>14</sup>

Vankomycin je tricyklické glykopeptidové antibiotikum původně pocházející z organismu *Streptococcus orientalis* (Obr. 1). Z chemického hlediska se jedná o komplexní organickou molekulu s heptapeptidovou částí, která tvoří jádro léčiva a je spojena s cukernou složkou.<sup>15</sup> Vankomycin je hydrofilní léčivo s hodnotou log P -3,1.<sup>16</sup> Hlavním způsobem podání vankomycinu je intravenózní infúze, protože při perorálním podání má omezenou biologickou dostupnost. Vzhledem k hydrofilní povaze se 80–90 % léčiva vylučuje močí v nezměněné formě. Vankomycin má úzký terapeutický index, proto léčba vyžaduje terapeutické monitorování.<sup>16</sup> Vankomycin má vynikající účinnost proti *Staphylococcus aureus* včetně meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA). Je také antibiotikem volby při intoleranci jiných antimikrobiálních látek.<sup>15</sup>

## Gentamicin



Registrační číslo CAS: 1403-66-3

Molární hmotnost: 477,6 g/mol

Vazba na bílkoviny: 0–30 %<sup>17</sup>

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

Obr. 2: Strukturální vzorec gentamicinu<sup>18</sup>

Gentamicin je aminoglykosidové antibiotikum, které bylo izolováno z organismu *Micromonospora purpurea* (Obr. 2).<sup>17</sup> Po chemické stránce se jedná o trisacharid obsahující atypické aminocukry.<sup>17,19</sup> Gentamicin je hydrofilní léčivo s log P -4,1.<sup>20</sup> Gentamicin vykazuje baktericidní aktivitu proti aerobním gramnegativním bakteriím, ale má nízkou aktivitu proti grampozitivním organismům. Nicméně, může být použity k léčbě *Staphylococcus aureus* a MRSA, ačkoli se u nich může snadno vyvinout rezistence.<sup>17</sup> Gentamicin má úzký terapeutický index, což je předpokladem terapeutického monitorování.<sup>20</sup> Vzhledem k tomu, že gentamicin má minimální gastrointestinální absorpci, jeho podávání se obvykle provádí parenterální cestou. Vzhledem ke své hydrofilitě se 90 % léčiva vylučuje ledvinami, což přímo souvisí s nefrotoxitou gentamicinu.<sup>21</sup>

## 7.2 Terapeutické systémy pro léčbu muskuloskeletálních infekcí

V současné době směřuje léčba muskuloskeletálních infekcí k lokálním metodám terapie. Systémové podávání léčiv má omezenou schopnost zlepšení průběhu muskuloskeletálních onemocnění, protože většina léčiv se neuvolňuje trvale nebo se neuvolňuje na správné místo. Naproti tomu lokální podávání léčiv umožňuje zajistit účinnější dodávku vyšších koncentrací antibiotik do místa infekce a zároveň minimalizuje rizika spojená se systémovou léčbou. Vysoké lokální hladiny antibiotik také usnadňují doručení léčiva difuzí do avaskulárních oblastí ran, které nejsou pro systémová antibiotika dostupná, a tím přispívají k efektivnějšímu usmrcení bakterií.<sup>22</sup>

V dnešní době existuje několik moderních metod léčby muskuloskeletálních infekcí, které se zaměřují na lokální podávání léků. Standardním příkladem je kostní cement s antibiotickou náplní (ALBC), který je často používán v ortopedické chirurgii. Další metody zahrnují přidávání antibiotik do kostního štěpu nebo biopolymerů, přičemž antibiotikum se adsorbuje na povrch těchto materiálů a následně se uvolňuje do prostředí rány.<sup>23</sup> Nosiče používané pro lokální podávání antibiotik lze klasifikovat na nebiodegradovatelné (např. polymethylmetakrylátové kuličky) a biodegradovatelné, kterým se v současnosti dává přednost. Mezi biodegradovatelné nosiče se řadí kostní štěpy, náhrady kostních štěpů, materiály na bázi přírodních polymerů a syntetické polymery. Nevýhodou nebiodegradovatelných nosičů je nutnost jejich chirurgického odstranění po ukončení uvolňování antibiotika, které obvykle probíhá čtyři týdny po jejich implantaci. Biodegradovatelné nosiče nevyžadují sekundární chirurgické zákroky k odstranění cizorodého materiálu.<sup>24</sup>

### **7.2.1 Kostní cement s antibiotickou náplní (ALBC)**

Koncepce lokálního podávání antibiotik inkorporací gentamicinu do akrylového kostního cementu byla představena v roce 1970.<sup>23</sup> Toto depotní podávání antibiotik se používá jako profylaktická a terapeutická metoda pro léčbu muskuloskeletálních infekcí. Pro profylaxi by se měl používat kostní cement s nízkou dávkou antibiotické náplně ( $\leq 1$  g antibiotika na dávku cementu) a pro léčbu je indikována vysoká dávka kostního cementu s antibiotickou náplní ( $> 1$  g antibiotika na dávku cementu).<sup>25</sup> Bylo prokázáno, že pro účinnou kinetiku vylučování a dosažení ustálené terapeutické hladiny antibiotika je žádoucí poměr alespoň 3,6 g antibiotika na 40 g akrylátového cementu.<sup>26</sup> V současné době jsou komerčně dostupné pouze nízkodávkové systémy s tobramycinem nebo gentamicinem. Kostní cement s vysokou dávkou antibiotika vyžaduje ruční míchání chirurgem. Jednou z hlavních nevýhod ALBC je, že reziduální subinhibiční dávky antibiotika v kostním cementu mohou potencovat recidivu infekce.<sup>25</sup>

### **7.2.2 Kostní štěpy a jejich náhrady**

Kostní štěp lze definovat jako jakýkoli implantovaný materiál, který sám nebo v kombinaci s jinými materiály podporuje kostní hojení.<sup>27</sup> Kostní štěpy lze obecně rozdělit na autotransplantáty, alotransplantáty, xenotransplantáty, syntetické materiály a jejich kombinace. Autotransplantátem se označuje kostní tkáň odebraná a implantovaná témuž jedinci. Alograft je tkáň, která byla odebrána jednomu jedinci a implantována jinému jedinci stejného druhu. Xenotransplantát je kostní tkáň odebraná z jednoho druhu a implantovaná do jiného druhu. Kvůli silné imunitní reakci se xenotransplantáty používají omezeně. Syntetickými materiály se rozumí různé extrahované nebo syntetizované proteinové růstové faktory. V současné době jsou lidské alogenní materiály považovány za nejúčinnější a nejdostupnější druh kostních štěpů.<sup>28</sup> Antibiotika lze do kostních štěpů inkorporovat ve formě prášku nebo namáčením kostního štěpu do roztoku antibiotika.<sup>27</sup>

Mezi nejčastější náhrady kostních štěpů, používané v klinické praxi, patří síran vápenatý, hydroxyapatit vápenatý a fosforečnan vápenatý. Lékař musí do těchto materiálů přimíchat antibiotika před aplikací a vytvořit tak lokální nosič antibiotik. Nejčastěji se v klinické praxi používá minerální nosič s obsahem 1 g vankomycinu na 25 g síranu vápenatého.<sup>27,29</sup> Zahřátím minerální soli na teplotu vyšší než 1000 °C vzniká procesem spékání materiál zvaný keramika. Mezi další často používané materiály patří bioaktivní skla a demineralizovaný kostní matrix. Bioaktivní sklo představuje kombinaci materiálu na bázi oxidu křemičitého s biokompatibilním

materiálem, jako je fosforečnan vápenatý. Výhodou bioaktivního skla je rychlejší působení na kostní defekt než působení minerálních náhrad nebo keramiky. Demineralizovaná kostní matrix (DBM) je alogenní kostní štěp, který byl demineralizován a chemicky a radiačně zpracován. Výhodou těchto materiálů je zajištění vysokých lokálních koncentrací antibiotik, urychlení procesu regenerace kosti a zabránění riziku přenosu choroboplodných zárodků.<sup>27</sup>

### **7.2.3 Polymery**

Polymery používané při léčbě MI musí být biokompatibilní, neimunogenní a netoxické pro procesy hojení kostí a měly by být biologicky odbouratelné.<sup>30</sup>

Přírodní polymery mají dobrou biokompatibilitu a osteoindukční vlastnosti. Do této kategorie patří kolagen, chitosan, kyselina hyaluronová, algináty, fibrin a trombin. Nejčastěji používaným nosičem z přírodních polymerů v klinické praxi je kolagen.

Syntetické polymery vykazují lepší farmakokinetické vlastnosti ve srovnání s nosiči z přírodních polymerů.<sup>30</sup> V dnešní době se nejčastěji používají kyselina polymléčná (PLA), kyselina poly(mléčná-*ko*-glykolová) (PLGA), poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) a polyethylenglykol (PEG).<sup>31,32</sup>

### **7.2.4 Částicové systémy pro léčbu muskuloskeletálních infekcí**

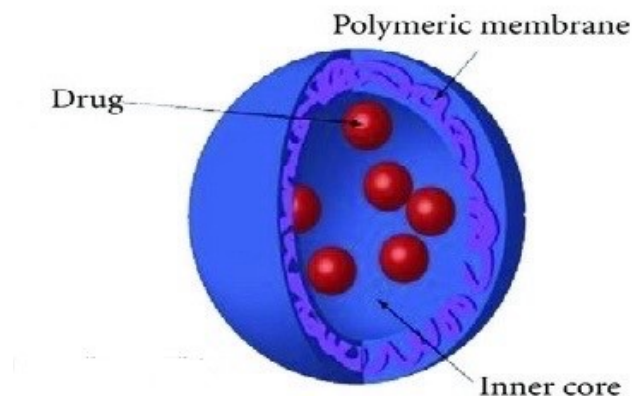
Existuje mnoho různých nanodávkovacích systémů, jako jsou lipozómy, polymerní nanočástice, pevné lipidové nanočástice, nanoemulze, micelární systémy a nanosuspenze.<sup>33</sup>

#### ***Nanočástice***

Nanočástice mají průměr menší než 1  $\mu\text{m}$  a jako nosiče antibiotik představují významný technologický a lékařský průlom (Obr. 3). Pro optimální terapeutický účinek jsou důležité vlastnosti nanočástic jako velikost, enkapsulační účinnost, povrchový náboj a liberační profil léčiva. Nanočástice jsou vhodné pro intravenózní podání. Nejmenší kapiláry v těle mají průměr 5–6  $\mu\text{m}$ . Velikost částic distribuovaných do krevního oběhu musí být výrazně menší než 5  $\mu\text{m}$ , aby v případě vzniku agregátů nezpůsobily embolii. Polymerní nanočástice se připravují z přírodních nebo syntetických polymerů. Přírodní polymery se k tomuto účelu příliš nepoužívají, protože se liší čistotou a často vyžadují zasítování, které by mohlo denaturovat inkorporované léčivo. Podstatně větší pozornost je věnována syntetickým polymerům, zejména kyselině polymléčné (PLA), polyglykolové (PGA) a polymléčné-*ko*-glykolové (PLGA).<sup>34</sup> Produkty jejich hydrolytické biodegradace jsou kyselina mléčná (LA) a kyselina glykolová (GA), které jsou biologicky inertní vůči rostoucím buňkám a jsou z těla odstraňovány běžnými metabolickými cestami.

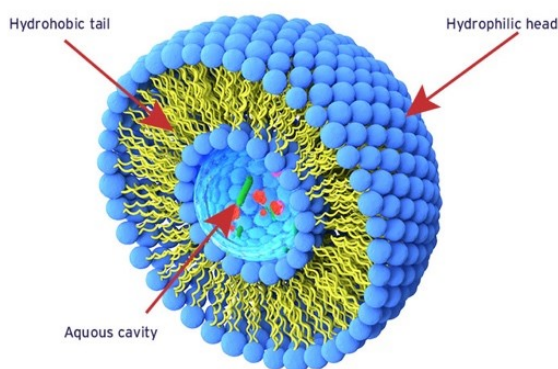


Rychlost degradace, a tím i uvolňování inkorporovaného léčiva, je ovlivněna molární hmotností, poměrem LA a GA, vlastnostmi léčiva, finální aplikační formou a pH v místě uvolňování.<sup>35,36</sup>



Obr. 3: Struktura nanočástice<sup>37</sup>

Lipozómy jsou sférické vezikuly charakterizované dvojvrstvou fosfolipidů s vnitřní hydrofilní dutinou (Obr. 4).<sup>38</sup> Hydrofobní léčiva jsou umístěny v membráně dvojvrstvy, zatímco hydrofilní molekuly jsou zachyceny v dutině. Tyto nosiče umožňují stabilizaci léčiv a jejich průnik přes membrány, což umožňuje účinné doručení léčiv do cílových míst s minimální toxicitou pro organismus. Výhody lipozómů zahrnují biokompatibilitu, možnost inkorporace velkého množství léčiv a možnost modifikace jejich vlastností.<sup>39</sup> Mezi nevýhody lipozómů patří nízká stabilita a rychlý únik ve vodě rozpustných léčiv.<sup>40</sup>



Obr. 4: Struktura lipozómu<sup>38</sup>

### ***Pevné lipidové nanočástice (SLN)***

Pevné lipidové nanočástice jsou složeny z pevných lipidů nebo směsi pevných a kapalných lipidů.<sup>41</sup> Použití pevných lipidů namísto tekutých je technologicky výhodnější. Lipidové nanočástice mají obvykle kulovitý tvar s průměrem v rozmezí 10 až 1000 nm. Mají pevné lipidové jádro, které je stabilizováno pomocí emulgátorů.<sup>42</sup> Lipidové nanočástice mají mnoho výhod, jako je snadná výroba, biokompatibilita a biologická odbouratelnost, nízký toxický potenciál, možnost řízeného uvolňování léčiv, solubilizace léčiv a možnost inkorporace jak hydrofilních, tak lipofilních léčiv.<sup>41</sup> Lipidové nanočástice však mají i své nevýhody, a to zejména zvětšování velikosti částic, nepředvídatelná tendence ke gelaci a vysoký burst, kdy se velká část účinné látky rychle uvolní během několika prvních minut a hodin.<sup>43</sup>

### ***Polymerní micely***

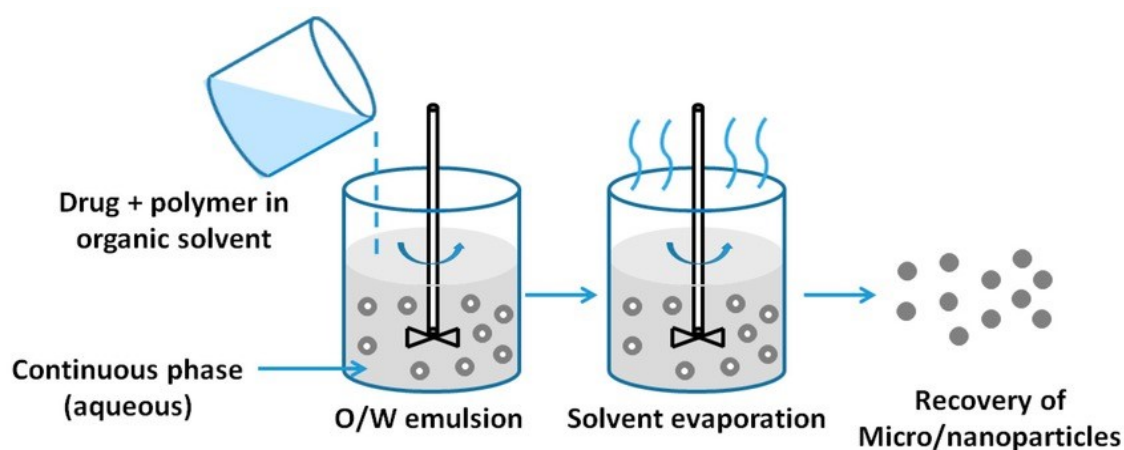
Polymerní micely jsou složeny z amfifilních kopolymerů, které mají odlišné hydrofobní a hydrofilní blokové domény.<sup>44</sup> Ve vodním prostředí dochází k fázovému oddělení hydrofobních a hydrofilních segmentů a k vytvoření nanoskopických supramolekulárních struktur typu jádro-plášť o velikosti 10–200 nm.<sup>45</sup> Pro tvorbu hydrofilní části micel se nejčastěji používá polyethylenglykol (PEG), pro hydrofobní segmenty se nejčastěji používají hydrofobní polyestery, polypeptidy a polyethery.<sup>46</sup> Polymerní micely jsou potenciálními nosiči pro dodávání nerozpustných a špatně rozpustných léčiv.<sup>45</sup>

## **7.3 Metody přípravy PLGA nanočástic**

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit na techniky *bottom-up* a *top-down*. Techniky *bottom-up* zahrnují metody jako emulzní nebo mikroemulzní polymerace, mezifázová polymerace a srážecí polymerace a jako výchozí bod je využíván monomer. Odpařování rozpouštědla, nanoprecipitace, emulzně-difuzní metoda, vysolování nebo dialýza jsou techniky *top-down*, při kterých jsou nanočástice formulovány z předem syntetizovaného polymeru.<sup>47</sup> Volba metody přípravy je ovlivněna povahou enkapsulované léčivé látky. Především jde o hydrofilitu nebo naopak o hydrofobicitu. Pro přípravu nanočástic s hydrofobním léčivem je možno použít metodu jednoduché emulgace, suspenzně-emulzní metodu, metodu vysolování nebo metodu nanoprecipitace. Pro přípravu nanočástic s hydrofilním léčivem se nejčastěji používá dvojitě-emulzní metoda.<sup>48</sup>

### 7.3.1 Metoda jednoduché emulgace

Metoda jednoduché emulgace je nejčastějším postupem pro formulaci polymerních nanočástic.<sup>47</sup> Úspěšnější je enkapsulace hydrofobních léčiv, v případě hydrofilních léčiv je problém s jeho rozpustností v organické fázi. Ve výjimečném případě může být hydrofilní léčivá látka dispergovaná v organické fázi ve formě suspenze.<sup>49</sup> Metoda je založena na emulgaci organického roztoku polymeru ve vodní fázi s následným odpařením organického rozpouštědla (Obr. 5). Rozpuštěním polymeru v organickém rozpouštědle se připraví organická fáze (O), ve které se pak rozpustí nebo disperguje léčivo. Organická fáze (O) se následně přidá k vodnímu roztoku povrchově aktivní látky (V). Sonifikací nebo mikrofluidizací se provede homogenizace za vzniku emulze O/V. Odpařování organického rozpouštědla vede k vysrážení polymeru ve formě nanočástic.<sup>50,51</sup>

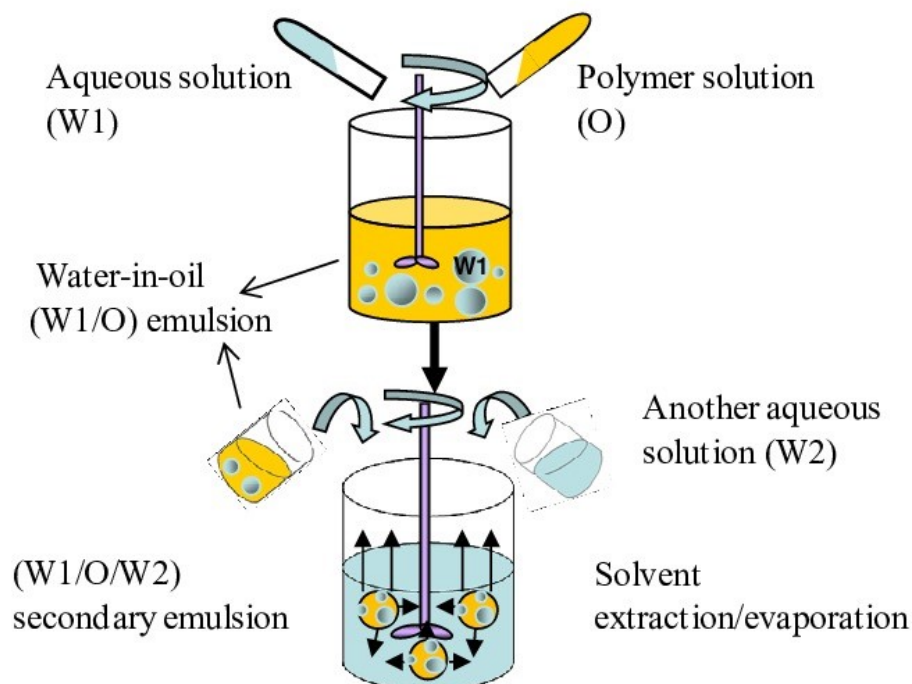


Obr. 5: Příprava nanočástic metodou jednoduché emulgace<sup>52</sup>

### 7.3.2 Dvojitě-emulzní metoda

Dvojitě-emulzní metoda (Obr. 6) je modifikací předchozí metody a je vhodná pro enkapsulaci hydrofilních léčiv.<sup>48</sup> Prvním krokem metody je vytvoření primární emulze typu voda v oleji ( $V_1/O$ ), kde vnitřní vodnou fází ( $V_1$ ) je roztok léčivé látky a vnější fázi (O) je roztok polymeru v organickém rozpouštědle. Primární emulze se poté reemulguje ve vnější vodní fázi ( $V_2$ ), která obsahuje roztok vhodné povrchově aktivní látky.<sup>53</sup> Dochází ke vzniku sekundární emulze typu voda v oleji ve vodě ( $V_1/O/V_2$ ). Odpařením organického rozpouštědla dojde k tvorbě nanosuspenze.<sup>47</sup> Hlavním problémem při enkapsulaci hydrofilní molekuly je rychlá difúze látky do vnější vodní fáze během sekundární emulgace. To může mít za následek malou účinnost enkapsulace.<sup>48</sup> Únik látky však lze snížit použitím polymeru

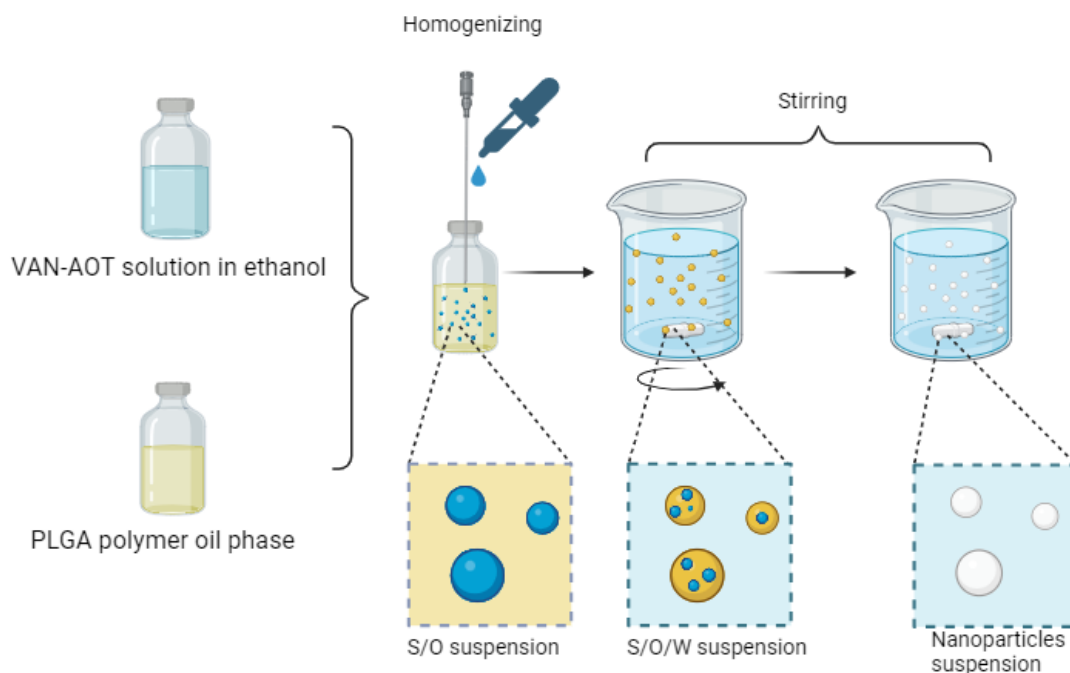
o vysoké molární hmotnosti, vysokou koncentrací polymeru a zvýšením viskozity vnitřní vodní fáze.<sup>54</sup>



Obr. 6: Příprava nanočástic dvojitě-emulzní metodou<sup>55</sup>

### 7.3.3 Suspenzně-emulzní metoda

K překonání nevýhod dvojitě-emulzní metody byla vyvinuta nová metoda pro enkapsulaci některých hydrofilních léčivých látek, založená na tvorbě disperze tuhé látky v oleji a pak ve vodě (S/O/V) (Obr. 7).<sup>56</sup> Při této metodě se účinná látka (S) suspenduje do roztoku polymeru v organickém rozpouštědle (O) za vzniku primární disperze (S/O). Primární disperze se poté po kapkách přidá k roztoku povrchově aktivní látky ve vodě (V) a homogenizací ultrazvukem se vytvoří finální disperze (S/O/V). Po odpaření organického rozpouštědla dojde k tvorbě nanosuspenze.<sup>49</sup> Stabilita disperze S/O/V je ovlivněna různými faktory, jako je adsorpce pevných částic na rozhraní kapalin.<sup>57</sup> Rovněž pevný stav hydrofilního léčiva může výrazně napomoci snížit únik léčiva z nanočástic. Metodou S/O/V tak lze výrazně zvýšit enkapsulační účinnost hydrofilních léčivých látek.<sup>56</sup>



Obr. 7: Příprava nanočástic suspenzně-emulzní metodou<sup>56</sup>

### 7.3.4 Metoda nanoprecipitace

Metoda je založena na precipitaci polymeru po vytěsnění semipolárního rozpouštědla z hydrofobního roztoku.<sup>58</sup> Léčivo musí být rozpuštěno nebo dispergováno v roztoku polymeru v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. Tato disperze se pak po kapkách přidává do vodního roztoku povrchově aktivní látky. Nanočástice se tvoří okamžitě rychlou difúzí rozpouštědla do vnější vodní fáze. Nakonec se rozpouštědlo odstraní odpařováním.<sup>47</sup> Tato technika je snadná, reprodukovatelná, používá méně toxická rozpouštěla, získané nanočástice mají úzkou distribuci velikosti.<sup>59</sup> Hlavní nevýhodou je požadavek nízké rozpustnosti léčivé látky ve vodě z důvodu minimalizace ztrát při difúzi rozpouštědel.<sup>47,60</sup>

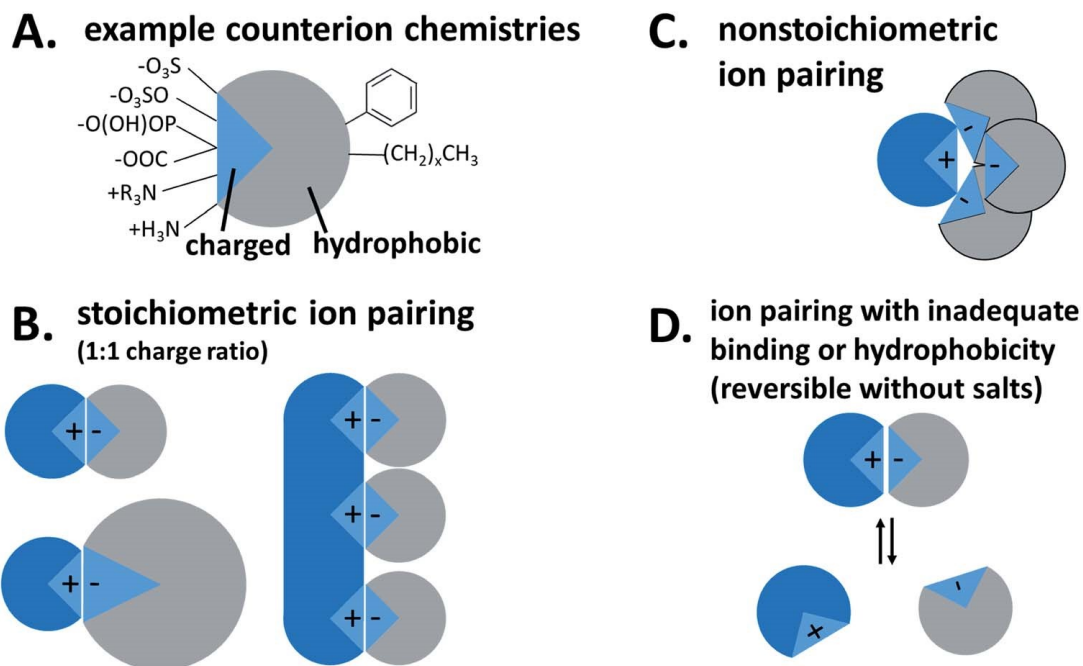
### 7.3.5 Metoda vysolování

Metoda vysolování spočívá nejprve v přípravě organické fáze (O) tvořené roztokem polymeru v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. Vodnou fází (V) je nasycený roztok elektrolytu s povrchově aktivní látkou, přičemž použité elektrolyty by neměly být rozpustné v organickém rozpouštědle.<sup>52</sup> Nejčastěji se používají hexahydrát chloridu hořečnatého nebo tetrahydrát octanu hořečnatého.<sup>61</sup> Za intenzivního míchání se organická fáze emulguje ve vodní fázi. Do vytvořené emulze O/V se přidává opět za intenzivního míchání čištěná voda, aby se snížila iontová síly elektrolytu. Současně dochází k migraci organického rozpouštědla

do vodní fáze, což vede k tvorbě nanočástic.<sup>62</sup> Posledním krokem je čištění disperze nanočástic odstředěním, aby se odstranilo vysolovací činidlo.<sup>52</sup>

#### **7.4 Hydrofobní iontové párování**

Nízká enkapsulační účinnost hydrofilních léčiv často brání rozvoji a uplatnění nanočásticových formulací ve farmacii. Vhodným řešením tohoto problému je modifikace léčivých látek metodou hydrofobního iontového párování. Hydrofobní iontové párování (HIP) je metoda přeměny ionizovaných hydrofilních molekul na hydrofobní komplexy prostřednictvím interakce s povrchově aktivními látkami (Obr. 8). Tato technika se používá ke zvýšení rozpustnosti a stabilizaci hydrofilních sloučenin v organických rozpouštědlech, ke zvýšení jejich permeability a k účinnému začlenění hydrofilních léčiv do hydrofobních nosičů. Jedním z nejčastějších využití hydrofobního iontového párování je zvýšení enkapsulace nabitých hydrofilních léčiv do nanočástic.<sup>63</sup> Během procesu HIP vzniká mezi kladně nabitou molekulou léčiva a záporně nabitou povrchově aktivní látkou komplex s neutrálním nábojem. To vede k maskování přirozeného náboje léčiva, a tím ke snížení jeho rozpustnosti ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. Hydrofobicita komplexu je zvýšena tím, že hydrofobní skupiny surfaktantu pokrývají povrch původní molekuly.<sup>64</sup> Komplexace látek metodou HIP je považována za přístup cílené terapie. Léčivo je chráněno před enzymatickou degradací, prodlouží se jeho biologický poločas, zvýší se biologická dostupnost a sníží se toxicita. Lze dosáhnout řízeného uvolňování léčiva a všeobecného zvýšení terapeutické účinnosti přípravku.<sup>63</sup>

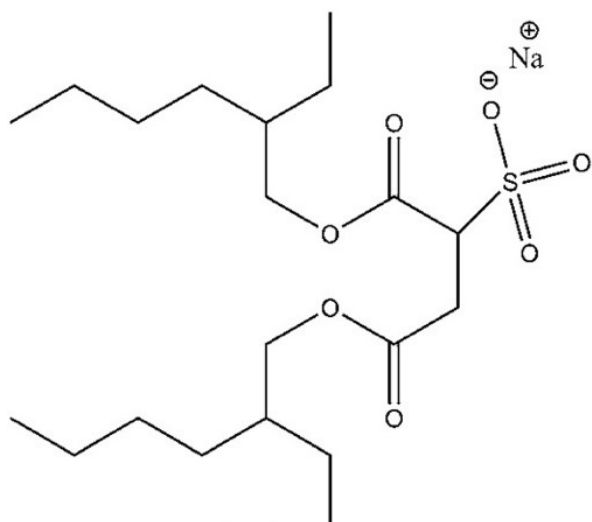


Obr. 8: Princip hydrofobního iontového párování<sup>63</sup>

Uvolňování hydrofobního komplexu léčiva po jeho začlenění do hydrofobního nosiče závisí na výsledné míře hydrofobnosti komplexu, která je dána především vlastnostmi zvoleného surfaktantu, protože hydrofobicita surfaktantu dobře koreluje s hydrofobicitou výsledného komplexu. Aniontové surfaktanty jsou preferovány před kationtovými z důvodu toxicity, proto řada komerčně dostupných aniontových hydrofobních surfaktantů je vysoká. Z nich největší potenciál jako aniontová povrchově aktivní látka vykazuje ve mnoha studiích dokusát sodná sůl (AOT).<sup>65</sup>

AOT je aniontová povrchově aktivní látka, která obsahuje sulfosukcinátovou skupinu, stabilizovanou sodným kationtem a dva rozvětvené alkylové řetězce (Obr. 9). AOT významně zvyšuje hydrofobicitu léčiv, což přispívá k jejich vyšší enkapsulační účinnosti v částicových systémech. AOT také působí jako sterický stabilizátor a brání agregaci nanočástic.<sup>66</sup>





Registrační číslo CAS: 577-11-7

Molární hmotnost: 444,57 g/mol<sup>67</sup>

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>NaO<sub>7</sub>S

Hydrofilně-lipofilní rovnováha (HLB): 10<sup>68</sup>

Obr. 9: Strukturální vzorec dokusát sodné soli (AOT)<sup>69</sup>

Při formulaci PLGA nanočástic s vankomycin hydrochloridem a gentamicin sulfátem je velkým problémem rychlý únik hydrofilních antibiotik do vnější vodní fáze, což vede k nízké enkapsulační účinnosti a malému obsahu účinné látky v nanočásticích. Důsledkem je vysoký burst efekt a krátká doba liberace léčiva, protože tyto látky jsou vysoce hydrofilní a kvůli tomu mají nízkou afinitu k hydrofobnímu PLGA. Nízká EE představuje obrovské plýtvání antibiotiky, což je nejen ekonomický, ale také i ekologický problém a zvyšuje se riziko rozvoje antibiotické rezistence.<sup>70,71</sup> Pro překonání těchto problémů byly formulovány hydrofobní komplexy VAN a GEN metodou hydrofobního iontového párování. Jako surfaktant byl zvolen dokusát sodná sůl (AOT), protože VAN a GEN mají ve struktuře aminové skupiny, které lze snadno protonovat a se kterými anionický AOT reaguje za vzniku komplexů s přibližně neutrálním nábojem. Konečný produkt má zachované terapeutické vlastnosti, je hydrofobnější a díky tomu má vyšší afinitu k PLGA a lipidovým nosičům, což vede ke zvýšení EE a prodlouženému uvolňování léčiva.<sup>64</sup>

#### 7.4.1 Enkapsulace hydrofobních komplexů do PLGA částic

Byly publikovány studie týkající se použití GEN-AOT při formulaci PLGA nanočástic určených k léčbě infekcí jater a sleziny způsobených bakterií *Brucella melitensis*. EE byla téměř 100 % a LC až 60 %. Bylo dosaženo prodlouženého uvolňování léčiva po dobu 70 dnů.<sup>72,73</sup>

Kashi a kol. zkoumali různé metody enkapsulace minocyklinu do PLGA nanočástic. Ukázalo se, že metoda HIP minocyklinu s dextran sulfátem poskytuje nejvyšší hodnoty LC a EE (1,92 ± 0,19 %, resp. 29,95 ± 2,47 %). Ačkoli dosažená EE ještě nebyla optimální,



NČ vykazovaly lepší účinnost při inhibici růstu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* než původní léčivo.<sup>74</sup>

Metodu HIP použili k tvorbě komplexu tobramycinu s AOT také Hill a kol. EE při formulaci PLGA NČ dosáhla hodnoty až 96,8 %, LC byla až 27,4 %. Formulace také zajistila prodloužené uvolňování léčiva po dobu více než 12 dnů a aktivitu proti *S. aureus* stejnou jako v případě použití samotného tobramycinu.<sup>75</sup>

Podobně byl modifikován minocyklin a vzniklý komplex byl enkapsulován do PLGA NČ. Výsledky ukázaly zvýšené hodnoty EE a LC ve srovnání s hydrofilní formou minocyklinu, kde EE byla 43 % a hodnota LC byla 1,12 %. Také bylo dosaženo téměř lineárního profilu uvolňování *in vitro* po dobu 30 dnů s nízkým počátečním bustem.<sup>76</sup>

## 7.5 Hodnocení nanočástic

Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic mají obrovský vliv na jejich terapeutické a toxikologické účinky, proto je hodnocení jejich vlastností rozhodující pro určení účinnosti a bezpečnosti nanočástic.<sup>77</sup> Mezi nejdůležitější charakteristiky patří velikost, povrchový náboj, tvar a povrch nanočástic. Neméně důležitými charakteristiky jsou také EE a LC, protože této charakteristiky určují množství léčiva v nanočásticích, které pak bude mít terapeutický účinek. K charakterizaci nanočástic se používá řada různých technik, některé vlastnosti lze hodnotit i více než jednou metodou. Někdy standardizované metodiky nebo regulační protokoly pro hodnocení nanočástic zatím chybí.<sup>78</sup>

### 7.5.1 Stanovení velikosti

Velikost nanočástic je klíčovým faktorem, který určuje pronikání NČ přes fyziologické bariéry, lokalizaci v různých místech organismu a dokonce i jejich vstup do buněk.<sup>77</sup> Nanočástice menší než 10 nm mohou být snadno eliminovány fyziologickými procesy, např. filtrací ledvinami, zatímco částice větší než 200 nm mohou být odstraněny fagocytujícími buňkami v retikuloendoteliálním systému (RES). Optimální velikostí pro terapeutickou účinnost nanočástic je rozmezí 20–200 nm, protože tyto nanočástice mají delší dobu cirkulace v krevním řečišti a vykazují vyšší míru akumulace právě proto, že nemohou být rozpoznány RES a filtrovány ledvinami.<sup>79</sup>

Jednou z nejčastějších technik používaných pro měření velikosti nanočástic je laserová difrakce. Laserové metody rozptylu světla, jako je dynamický rozptyl světla (DLS) neboli fotonová korelační spektroskopie (PCS), jsou založeny na dynamickém rozptylu laserového paprsku určité vlnové délky (zpravidla v rozmezí 2–500 nm) částicemi

v kapalném médiu.<sup>80</sup> Při Brownovu pohybu částic dochází u rozptýleného a difraktovaného laserového paprsku k frekvenčnímu posunu, který se analyzuje pomocí vhodného detektoru. Výsledkem tohoto měření je hydrodynamický průměr a index polydisperzity.<sup>81</sup> Technika je rychlá, relativně snadná a levná, ale může poskytnout zkreslené výsledky při analýze vzorků s částicemi různých velikostí. Neschopnost detekovat přítomnost menších částic mezi většími je způsobena skutečností, že intenzita rozptylu závisí na šesté mocnině poloměru částice, takže větší částice mají tendenci pokrýt signál přicházející z částic menších.<sup>80</sup> Dále je také důležité dbát na čistotu kyvet, pipet a stříkaček, protože prach nebo mikrobubliny zanesené do vzorku mohou způsobit zkreslení signálu.<sup>82</sup>

Index polydisperzity (PDI) vyjadřuje stupeň rozložení velikosti nanočástic ve vzorku.<sup>83</sup> Jedná se o bezrozměrné číslo, které má hodnoty v rozmezí 0 až 1. Nižší hodnoty PDI naznačují nanočástice s homogenním rozložením velikosti. Hodnota PDI 0,1 představuje monodisperzitu, hodnoty větší než 0,1 indikují polydisperzitu vzorku, přičemž hodnoty mezi 0,1 a 0,25 indikují úzkou distribuci velikosti částic.<sup>84</sup>

### ***7.5.2 Hodnocení stability a stanovení povrchového náboje***

Stabilita nanočástic může být ovlivněna jedním nebo více faktory, jako je teplota, vlhkost, kvalita rozpouštědla, pH, velikost částic, ionizující a neionizující záření, enzymatická degradace, a dokonce i přítomnost dalších pomocných látek a nečistot.<sup>85</sup> Zásadním problémem souvisejícím se stabilitou je aglomerace a růst částic v nanosuspenzích.<sup>86</sup>

Stabilitu nanosuspenzí lze zvýšit použitím povrchově aktivních látek, které potahují nanočástice a vedou k elektrostatickému odpuzování mezi nimi, čímž významně snižují aglomeraci částic způsobenou van der Waalsovými přitažlivými silami.<sup>87</sup> Navzdory významným problémům spojeným se screeningem stabilizátorů je jejich použití stále nejběžnějším a preferovaným přístupem ke zvýšení stability nanosuspenzí.<sup>86</sup>

Stabilita disperzních soustav je také ovlivněna elektrickými vlastnostmi dispergovaných částic, které jsou definovány typem a hustotou distribuce nabitých částic (iontů) na povrchu částice. Částice získá náboj po uvedení do roztoku elektrolytu tím, že dojde k adsorpci iontů na její povrch. Ionty, které se adsorbují na povrchu částice, tvoří Sternovu vrstvu, zatímco zbývající ionty se přitahují elektrostatickou silou a tvoří difúzní vrstvu. Difúzní vrstva se pohybuje s částicí a její vnější hranice se nazývá kluzná plocha. Rozložení iontů se mění se vzdáleností od povrchu částice a vytváří elektroneutrální oblast. Zeta potenciál ( $\zeta$ ) vyjadřuje rozdíl potenciálů mezi kluzným povrchem a elektroneutrální oblastí a slouží jako měřítko

povrchového náboje a koloidní stability.<sup>88</sup> Suspenze, které mají  $|\zeta| \geq 30$  mV, se obvykle považují za koloidně stabilní.<sup>89</sup>

### **7.5.3 Stanovení tvaru**

Tvar nanočástic je běžně charakterizován použitím mikroskopických technik s vysokým rozlišením, jako je transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM).<sup>90</sup>

SEM je založená na skenování povrchu vzorku fokusovaným svazkem elektronů. Dochází k interakci mezi vzorkem a elektronovým paprskem, což vede k emisi elektronů, které jsou zachyceny detektorem. Signály interakcí elektronů s atomy ve vzorku poskytují informace o povrchu a složení vzorku.<sup>91</sup> Před vlastní analýzou pomocí SEM vzorky musí být adsorbovány na povrch mřížky a dokonale vysušeny, aby bylo možné je zavést do prostředí vysokého vakua. Vysušené vzorky nejsou elektricky vodivé, a proto se musí před vlastním pozorováním potáhnout tenkou vrstvičkou kovu s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí. Ta zajistí odvod záporného náboje a tepla, ve které se přemění většina energie urychlených primárních elektronů. Teplo, které lokálně uvolňují primární elektrony ve vzorku, je velké a projevuje se např. kontaminací skenované oblasti, pohybem preparátu pod svazkem nebo přímo jeho poškozením. Nejčastěji používanými kovy jsou hliník, měď a zlato.<sup>92</sup>

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je technika zobrazování vnitřní struktury pevných látek pomocí paprsku elektronů o vysoké energii přenášených pevnou látkou. Obraz se vytváří při interakci elektronů transmitovaných paprskem procházejícím vzorkem. TEM poskytuje přímé obrazy nanočástic v prostorovém rozlišení až na úroveň atomárních rozměrů (<1 nm).<sup>77</sup> Elektronová mikroskopie však typicky poskytuje dvojrozměrné obrazy tvaru částice, což by ve specifických případech mohlo vést k chybným odhadům morfologie částice.<sup>90</sup> Aby se toto omezení obešlo, lze charakterizaci morfologie částic provést pomocí elektronové tomografie.<sup>93</sup>

### **7.5.4 Stanovení EE a LC v nanočásticích**

#### ***Přímá metoda***

Pro stanovení EE a LC byla v této práci použita přímá metoda, která spočívá ve výpočtu koncentrace léčiva zachyceného v nanočásticích. U přímé metody se nanočástice musí nejprve rozpustit v organickém rozpouštědle (např. dichlormethan, acetonitril). To způsobí rozpuštění polymeru a vysrážení látky. Následným přidavkem vodního média, jako je pufr nebo čištěná voda, dojde k extrakci léčiva do tohoto média. Extrahovanou látku lze poté stanovit vhodnou

metodou.<sup>94</sup> Analýza VAN a VAN-AOT byla provedena pomocí HPLC, která je zlatým standardem detekce vankomycinu díky vysoké citlivosti, lepší specificitě, širokému lineárnímu rozsahu detekce a potřebě malého množství vzorku. Jedná se o separační a současně analytickou techniku, která slouží k identifikaci a kvantifikaci látky ve vzorku.<sup>96</sup> Pro analýzu GEN a GEN-AOT byla použita metoda spektrofotometrie, což je analytická metoda pro měření koncentrace látky v roztoku na základě pohlcování světla různých vlnových délek spektra. Spektrofotometrie se ukázala jako vhodná metoda pro detekci gentamicinu a jeho komplexu po derivatizaci vzorků oftaldialdehydovým reagentem (OPA). Vzniklý derivát umožňuje absorpci v UV oblasti a tím i stanovení množství látky ve vzorku.<sup>97</sup>

### ***Nepřímá metoda***

Při nepřímé metodě se EE stanoví výpočtem koncentrace neenkapsulovaného léčiva ve vodní fázi (supernatantu). Obecně platí, že EE stanovená nepřímou metodou vykazuje vyšší hodnoty než EE stanovená přímo v částicích.<sup>94</sup>

## 8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 8.1 Přístroje

Analytické digitální váhy, Kern Abs, max. 220 g, d = 0,1 mg

Centrifuga MPW-260R, MPW Med. Instruments

Digitální váhy, Kern 440–53, max. 6000 g, d = 1 g

Horkovzdušná sušárna, Memmert

HPLC, Agilent 1200

Mraznička, Vestfrost BSFS 290

pH-metr, Hanna Instruments HI221

Spektrofotometr Specord 205, Analytic Jena

Vakuová sušárna BINDER VD3, BINDER Inc.

Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments

Skenovací elektronový mikroskop FlexSEM 1000, Hitachi

### 8.2 Pomůcky

Automatická pipeta, Merck

Kolona chromatografická, Restek Ultra 100A, typ stacionární fáze: C18, velikost částic ( $\mu\text{m}$ ): 5, délka  $\times$  průměr (mm): 150  $\times$  4,6, Agilent 1200

Kyveta UV High Precision Cell 6030, Hellmy Analytics

Pipety s nastavitelným objemem Research, Eppendorf

Plastové centrifugační zkumavky, Eppendorf

Skleněná kyveta, Hellma Analytics

### 8.3 Chemické sloučeniny

2-merkptoethanol, Fluka

AOT (dokusát sodná sůl), Merck

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta s.r.o.

Dichlormethan, VERKON s.r.o.

Ethyl-acetát, Penta s.r.o.

Gentamicin sulfát, Dr. Kulich Pharma s.r.o.

Hydroxid sodný, Penta s.r.o.

Chlorid draselný, Penta s.r.o.

Chlorid vápenatý, Penta s.r.o.

Kyselina boritá, Lachema

Kyselina chlorovodíková, Lachema

Kyselina poly(mléčná-*ko*-glykolová) větvená na polyakrylátu (PLGA-A2), Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Methanol, Penta s.r.o.

Octan sodný trihydrát, Lachema

O-ftalaldehyd, Merck

Poloxamer 407 (Pluronic® F-127), Merck

Vankomycin hydrochlorid, Mylan

## 8.4 Příprava nanočástic

Nanočástice (NČ) byly připraveny dvojitě-emulzní metodou ( $V_1/O/V_2$ ), suspenzně-emulzní metodou ( $S/O/V$ ) nebo metodou jednoduché emulgace ( $O/V$ ). Jako účinné látky byly použity vankomycin hydrochlorid (VAN) a gentamicin sulfát (GEN) nebo jejich komplexy s dokusát sodnou soli (VAN-AOT a GEN-AOT). VAN a GEN byly použity v metodě  $V_1/O/V_2$ . Nanočástice s VAN-AOT byly připraveny metodou  $S/O/V$ , kde vnitřní fáze (S) byla suspenze VAN-AOT v roztoku PLGA-A2 v ethyl-acetátu (O). Nanočástice s GEN-AOT byly připraveny metodou  $O/V$ , kde vnitřní fází (O) byl roztok GEN-AOT a PLGA-A2 v ethyl-acetátu. Ve všech metodách byly použity čtyři různé koncentrace polymeru v organické fázi (25, 50, 75 nebo 100 mg/ml). Koncentrace surfaktantu ve vnější vodní fázi byla ve všech metodách stejná (viz Tab. 1).

Tab. 1: Metody přípravy nanočástic

Metoda	Vnitřní fáze	Organická fáze (O)	Vnější fáze ( $V_2$ )
$V_1/O/V_2$	VAN/GEN 5 mg/0,2 ml vody ( $V_1$ )	PLGA-A2 1 ml ethyl-acetátu	Poloxamer 407 25 mg/5 ml vody
$S/O/V_2$	5 mg VAN-AOT (S)	PLGA-A2 1 ml ethyl-acetátu a 0,43 ml absolutního ethanolu	
$O/V_2$	—	5 mg GEN-AOT PLGA-A2 1 ml ethyl-acetátu	

### 8.4.1 Příprava nanočástic dvojitě emulzní metodou

Dvojitě emulzní metoda byla použita pro přípravu PLGA NČ s VAN nebo GEN. Byla připravena vnější vodní fáze ( $V_2$ ) tvořená roztokem Poloxameru 407 o koncentraci 5 mg/ml. Na analytických vahách bylo naváženo 25 mg Poloxameru 407 a rozpuštěno v 5 ml čištěné vody. Organická fáze (O) byla tvořena roztokem PLGA-A2 v ethyl-acetátu o koncentracích 25, 50, 75 nebo 100 mg/ml. Na analytických vahách bylo naváženo 25, 50, 75 nebo 100 mg polymeru a rozpuštěno v 1 ml ethyl-acetátu. Vnitřní vodní fáze ( $V_1$ ) byla tvořena roztokem

antibiotik. Na analytických vahách bylo naváženo 5 mg VAN nebo GEN a rozpuštěno ve 0,2 ml vody čištěné vody.

K organické fázi byla přidána vnitřní vodní fáze a homogenizováno pomocí ultrazvukové sondy 15 s při 40 % cyklu na ledu za vzniku primární emulze V<sub>1</sub>/O. Primární emulze byla přidána k roztoku Poloxameru 407 a opět homogenizována pomocí ultrazvukové sondy 30 s při 40 % cyklu na ledu za vzniku sekundární emulze V<sub>1</sub>/O/V<sub>2</sub>. Sekundární emulze byla míchána na elektromagnetické míchačce rychlostí 500 ot/min po dobu 1,5 hod, aby došlo k odpaření ethyl-acetátu a vzniku nanosuspenze.

#### **8.4.2 Příprava nanočástic jednoduchou emulgací**

##### ***Příprava komplexu gentamicin sulfátu (GEN-AOT)***

Metodou HIP se surfaktantem AOT byl připraven hydrofobní komplex GEN-AOT. Bylo připraveno 500 ml pufru pH 5,0 rozpouštěním 0,41 g octanu sodného, 0,373 g chloridu draselného a 0,555 g chloridu vápenatého v 500 ml čištěné vody.<sup>72,98</sup> Hodnota pH 5,0 byla nastavena přidáním 0,1 M HCl po kapkách při kontrole pomocí pH-metru. Byl připraven roztok AOT v dichlormethanu (DCM) rozpouštěním 62,5 mg AOT v 500 ml DCM. Byl připraven roztok GEN v pufru pH 5,0 rozpouštěním 20 mg GEN v 500 ml pufru. Roztok AOT a roztok GEN byly smíchány ve skleněné uzavíratelné lahvi a ponechány na magnetické míchačce po dobu 3 hod při rychlosti 500 ot/min, aby proběhla reakce. Dále byla soustava ponechána v lahvi po dobu 10 min, aby došlo k oddělení vodní a organické fáze. Vodní fáze byla odpipetována a z organické fáze byl izolován iontový komplex odpařením organického rozpouštědla a sušením ve vakuové sušárně po dobu 15 min. Iontový komplex GEN-AOT byl skladován při 4 °C.

##### ***Jednoduchá emulgace***

Byla připravena vodní fáze (V) tvořená roztokem Poloxameru 407 o koncentraci 5 mg/ml. Na analytických vahách bylo naváženo 25 mg Poloxameru 407 a rozpuštěno v 5 ml čištěné vody. Vnitřní organická fáze (O) byla tvořena roztokem GEN-AOT a PLGA-A2 v ethyl-acetátu. Byly připraveny roztoky PLGA-A2 v ethyl-acetátu o pěti různých koncentracích rozpouštěním 25, 50, 75 nebo 100 mg polymeru v 1 ml ethyl-acetátu. V těchto roztocích bylo vždy rozpuštěno 5 mg GEN-AOT.

Organická fáze byla pomocí automatické pipety přidána do kádinky s vnější vodnou fází a vytvořená emulze O/V byla homogenizována na ledu pomocí ultrazvukové sondy 30 s při 40 % cyklu. Následně byla míchána na elektromagnetické míchačce rychlostí 500 ot/min po dobu 1,5 hod, aby došlo k odpaření ethyl-acetátu a ke vzniku nanosuspenze.



### **8.4.3 Příprava nanočástic suspenzně-emulzní metodou**

#### ***Příprava hydrofobního komplexu vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT)***

Metodou HIP se surfaktantem AOT byl připraven hydrofobní komplex VAN-AOT. Byl připraven 0,7 mM roztok VAN v 0,01 M HCl. Po kapkách byl přidán 0,1 M roztok AOT ve vodě. Reakce probíhala po dobu 2 hod na magnetické míchačce při rychlosti 500 ot/min. Vzniklý komplex VAN-AOT byl separován centrifugací při 12 000 ot/min po dobu 10 min, promyt 0,01 M HCl a sušen ve vakuové sušárně po dobu 15 min. Produkt byl skladován při teplotě 4 °C.

#### ***Suspenzně-emulzní metoda***

Byla připravena vnější vodní fáze (V) tvořená roztokem Poloxameru 407 o koncentraci 5 mg/ml. Na analytických vahách bylo naváženo 25 mg Poloxameru 407 a rozpuštěno v 5 ml čištěné vody. Byla připravena organická fáze tvořená suspenzí VAN-AOT v organickém roztoku polymeru (S/O). Byly připraveny roztoky PLGA-A2 v ethyl-acetátu o čtyřech různých koncentracích rozpuštěním 25, 50, 75 nebo 100 mg polymeru v 1 ml ethyl-acetátu. 5 mg VAN-AOT bylo rozpouštěno v 0,43 ml absolutního ethanolu a pomocí ultrazvukové sondy po dobu 15 s při 40 % cyklu bylo do těchto roztoků přidáno po kapkách. Vznikla suspenze VAN-AOT v roztoku PLGA-A2 v ethyl-acetátu (S/O).

V dalším kroku byla suspenze VAN-AOT v organickém roztoku PLGA-A2 přidána pomocí automatické pipety do 5 ml roztoku Poloxameru 407. Vytvořená soustava S/O/V byla homogenizována na ledu pomocí ultrazvukové sondy 30 s při 40 % cyklu a následně míchána na elektromagnetické míchačce rychlostí 500 ot/min po dobu 1,5 hod, aby došlo k odpaření ethyl-acetátu a ke vzniku nanosuspenze.

## **8.5 Měření velikosti, polydisperzity a zeta-potenciálu nanočástic**

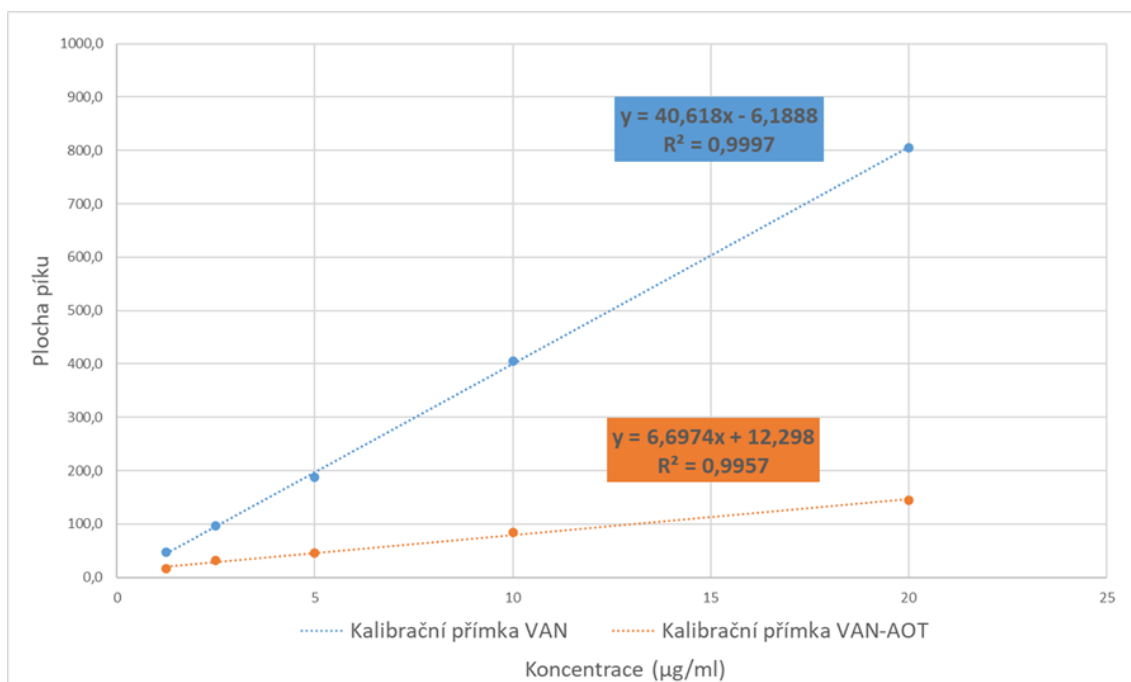
Měření se provádělo na přístroji Zetasizer Nano ZS. Přístroj byl zapnutý 30 min před začátkem měření, aby byl zkalibrován na teplotu 25 °C. Nanosuspenze byly měřeny bezprostředně po přípravě. Pro měření velikosti byly použity jednorázové kyvety z polymethylmethakrylátu, pro měření zeta potenciálu složené kapilární kyvety. 1 ml nanosuspenze byl aplikován do kyvet pomocí automatické pipety. Každý vzorek byl měřen třikrát. Byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka.

## 8.6 HPLC stanovení VAN a VAN-AOT

Pro sestavení kalibrační přímky VAN byl připraven základní roztok VAN v deionizované vodě o koncentraci 100 µg/ml. Navážka 10,0 mg VAN byla přenesena do odměrné baňky na 100 ml a rozpouštěna v deionizované vodě. Pro sestavení kalibrační přímky VAN-AOT byl připraven základní roztok VAN-AOT ve směsi acetonitrilu a methanolu (poměr 1:2) o koncentraci 100 µg/ml. Navážka 10,0 mg VAN-AOT byla přenesena do odměrné baňky na 100 ml a byla rozpouštěna ve směsi acetonitrilu a methanolu v poměru 1:2. Z připravených zásobních roztoků VAN a VAN-AOT byla připravena série vzorků o pěti různých koncentracích (1,25; 2,5; 5; 10 a 20 µg/ml). Bylo provedeno isokratické měření s nástřikem 20 µl. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 214 nm. Byla použita HPLC kolona C18 (150 × 4,6 mm). Mobilní fáze byla složená z acetonitrilu a 0,01 % roztoku kyseliny trifluoroctové ve vodě kvality *Milli-Q* v poměru 10:90. Stanovení HPLC bylo provedeno při teplotě 25 °C. Konstantní průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Na základě získaných hodnot ploch píků byly sestaveny kalibrační přímky a zjištěny rovnice lineární regrese (Tab. 2., Obr. 10).

Tab. 2: Hodnoty ploch píků vankomycin hydrochloridu (VAN) a komplexu vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) pro dané koncentrace kalibračních vzorků

	c (µg/ml)	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0
Plocha píku	VAN	47,4	96,6	188,4	405,4	805,3
	VAN-AOT	16,8	31,2	45,2	83,8	144,1



Obr. 10: Kalibrační přímka vankomycin hydrochloridu (VAN) (modrá přímka) a komplexu vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) (oranžová přímka)

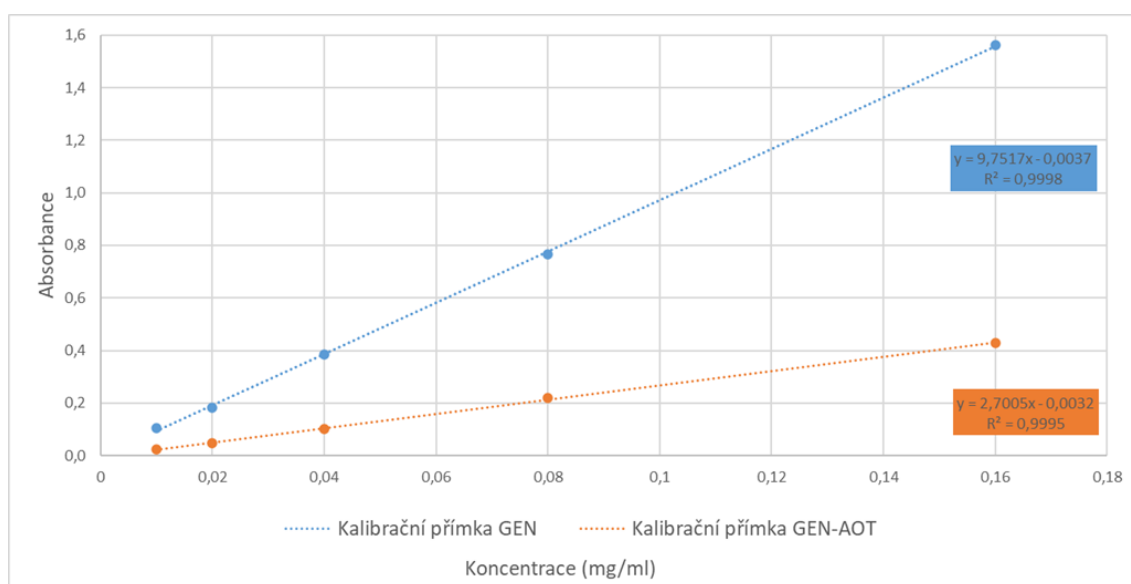
## 8.7 Spektrofotometrické stanovení GEN a GEN-AOT

Pro sestavení kalibrační přímky pro GEN nebo GEN-AOT bylo na analytických vahách naváženo 16 mg účinné látky a přeneseno do odměrné baňky o objemu 100 ml. Odměrná baňka byla naplněna roztokem borátového pufru pH 9,7, a byla uzavřena a míchána, dokud se látka úplně nerozpustila. Z připraveného zásobního roztoku byla připravena série vzorků o pěti různých koncentracích (0,01; 0,02; 0,04; 0,08 a 0,16 mg/ml). Pro analýzu vzorků byla provedena reakce s oftaldialdehydovým reagentem (OPA).

OPA reagent byl formulován přidáním 50 mg o-ftaldialdehydu, 1,25 ml methanolu a 60 µl 2-merkaptalethanolu do 11,2 ml roztoku borátového pufru o pH 9,7. Pro analýzu se 1 ml roztoku GEN, 1 ml isopropanolu a 1 ml OPA reagentu nechaly reagovat po dobu 30 min při pokojové teplotě bez přístupu světla. Byla měřena absorbance při vlnové délce 332 nm, byly sestaveny kalibrační přímky a zjištěny rovnice lineární regrese (Tab. 3., Obr. 11).

Tab. 3: Hodnoty absorbance zásobních roztoků pro analýzu gentamicin sulfátu (GEN) a komplexu gentamicin sulfátu (GEN-AOT)

c (mg/ml)	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16
VAN	0,1055	0,1837	0,3838	0,7645	1,5635
Absorbance					
VAN-AOT	0,0225	0,0489	0,1008	0,2183	0,4275



Obr. 11: Kalibrační přímka pro analýzu gentamicin sulfátu (GEN) (modrá přímka) a komplexu gentamicin sulfátu (GEN-AOT) (oranžová přímka) v borátovém pufru pH 9,7

## 8.8 Stanovení EE a LC v nanočásticích

### 8.8.1 VAN a GEN

Pro stanovení EE a LC byly nanosuspence centrifugovány ve dvou cyklech. 0,5 ml suspenze nanočástic bylo přeneseno pomocí automatické pipety do centrifugační zkumavky a centrifugováno nejprve po dobu 10 min rychlostí 8000 ot/min při 4 °C. Supernatant byl přenesen do jiné centrifugační zkumavky, sediment byl propláchnut třikrát 0,5 ml čištěné vody a znovu centrifugován za stejných podmínek. Supernatant vzniklý po první centrifugaci byl centrifugován po dobu 15 min rychlostí 15 000 ot/min při teplotě 4 °C. Po ukončení cyklu byl supernatant odstraněn, sediment byl propláchnut 0,5 ml čištěné vody a pak opět centrifugován za stejných podmínek. Sedimenty byly sušeny ve vakuové sušárně při 25 °C po dobu 1,5 hod. Vysušené nanočástice byly v centrifugační zkumavce dispergovány

v 0,5 ml dichlormethanu, aby došlo k rozpuštění polymerního nosiče z PLGA-A2 a vysrážení léčivé látky. Disperze byly důkladně promíseny. Byly přidány 2 ml čištěné vody (VAN) nebo 2 ml borátového pufru pH 9,7 (GEN) a každá centrifugační zkumavka byla opět protřepána. Tímto krokem došlo k extrakci léčiva do vodní fáze a k precipitaci polymeru. Následovala centrifugace po dobu 10 min rychlostí 15 000 ot/min při pokojové teplotě, aby došlo k separaci vodní a organické fáze a sedimentaci precipitovaného polymeru. 1 ml vodní fáze s léčivou látkou byl použit pro analýzu. Analýza VAN byla provedena pomocí HPLC (viz kap. 8.6), analýza GEN spektrofotometricky (viz kap. 8.7).

### **8.8.2 VAN-AOT a GEN-AOT**

Nanočástice s VAN-AOT byly dispergovány v 1 ml acetonitrilu, aby došlo k rozpuštění polymerního nosiče. Následně bylo přidáno 2 ml methanolu pro vznik precipitace polymeru. Vzorky byly centrifugovány po dobu 15 min rychlostí 15000 ot/min při pokojové teplotě. Po ukončení cyklu byl supernatant použit pro analýzu. V případě stanovení GEN-AOT byly nanočástice dispergovány v 0,1M NaOH a míchány po dobu 5 hod, aby došlo k hydrolyze polymerního nosiče. Supernatant byl smísen s borátovým pufrem pH 9,7 v poměru 1:2, aby bylo dosaženo absorpčního maxima při spektrofotometrickém měření. Analýza VAN-AOT byla provedena pomocí HPLC (viz. kap. 8.6), analýza GEN-AOT spektrofotometricky (viz. kap. 8.7).

### **8.8.3 Výpočet**

Byl vypočten procentuální podíl léčiva v nanočásticích (LC) podle vzorce:

$$LC = \frac{m_e}{m_n} \times 100 \quad (1)$$

LC *loading capacity* – procentuální podíl léčiva v nanočásticích (%)

$m_e$  množství antibiotika (vankomycin/gentamicin) stanoveného v nanočásticích (mg)

$m_n$  hmotnost nanočástic (mg)

Enkapsulační účinnost (EE) byla vypočtena podle vzorce:

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

EE      enkapsulační účinnost (%)

$m_e$     množství antibiotika (vankomycin/gentamicin) stanoveného v nanočásticích (mg)

$m_t$     množství antibiotika (vankomycin/gentamicin) použitého při přípravě (mg)

## 8.9 SEM

Byly připravené NČ s obsahem VAN-AOT a GEN-AOT, metodami S/O/V, resp.  $V_1/O/V_2$  s koncentrací PLGA-A2 25 mg/ml (viz podkap. 8.4.2 a 8.4.3). Vzorky ve formě přečištěné nanosuspenze byly předány Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. (Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, katedry fyziky) pro SEM hodnocení rastrovým elektronovým mikroskopem FlexSEM 1000 (Hitachi, Japonsko). Před měřením vzorky byly umístěny na uhlíkovou adhezivní pásku, vysušeny při laboratorní teplotě a upraveny nanosením 8 nm vrstvy zlata.

## 9 VÝSLEDKY

### 9.1 Charakteristiky PLGA nanočástic

Tab. 4: Charakteristiky PLGA nanočástic s gentamicin sulfátem (GEN)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	Velikost (nm)	ZP (mV)	PDI
25	1	103	-2,4	0,10
		101	-2,6	0,14
		102	-2,5	0,11
	2	133	-2,6	0,10
		132	-2,7	0,13
		130	-2,7	0,13
	3	113	-2,5	0,16
		113	-2,5	0,14
		113	-2,3	0,17
	Průměr ± SD		116 ± 13	-2,5 ± 0,1
50	1	159	-2,2	0,15
		157	-2,8	0,19
		155	-2,6	0,18
	2	120	-2,8	0,13
		120	-2,5	0,13
		121	-2,5	0,13
	3	114	-2,2	0,12
		116	-2,5	0,12
		114	-2,4	0,16
	Průměr ± SD		131 ± 20	-2,5 ± 0,2
75	1	143	-2,1	0,12
		142	-2,5	0,14
		141	-2,4	0,10
	2	172	-2,6	0,17
		170	-2,7	0,13
		171	-2,9	0,17
	3	141	-2,6	0,14
		143	-2,8	0,13
		141	-2,9	0,12
	Průměr ± SD		152 ± 15	-2,6 ± 0,2
100	1	151	-1,9	0,14
		149	-1,8	0,16
		150	-2,0	0,16
	2	182	-2,3	0,16
		182	-2,3	0,17
		178	-2,5	0,18
	3	155	-2,0	0,17
		155	-2,7	0,16
		156	-1,7	0,17
	Průměr ± SD		162 ± 14	-2,1 ± 0,3

Tab. 5: Charakteristiky PLGA nanočástic s vankomycin hydrochloridem (VAN)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	Velikost (nm)	ZP (mV)	PDI
25	1	107	1,6	0,15
		107	0,0	0,14
		107	0,1	0,13
	2	114	-0,2	0,15
		115	-0,5	0,11
		114	-0,6	0,14
	3	104	-0,2	0,14
		105	-0,3	0,10
		104	-0,2	0,11
	Průměr ± SD		108 ± 5	0,23 ± 0,6
50	1	121	0,3	0,15
		121	0,5	0,12
		121	0,5	0,12
	2	134	0,3	0,13
		133	0,2	0,14
		133	0,1	0,12
	3	155	-0,7	0,16
		154	-0,5	0,14
		156	-0,5	0,22
	Průměr ± SD		136 ± 15	0,0 ± 0,5
75	1	158	0,2	0,15
		158	0,1	0,11
		158	0,3	0,12
	2	181	0,9	0,16
		179	1,4	0,14
		183	0,7	0,16
	3	195	-0,2	0,13
		195	-0,3	0,06
		192	-0,1	0,11
	Průměr ± SD		178 ± 15	0,3 ± 0,5
100	1	197	0,4	0,17
		201	0,6	0,16
		200	0,6	0,17
	2	230	1,0	0,18
		229	0,6	0,16
		228	0,7	0,17
	3	226	0,3	0,19
		227	0,3	0,15
		271	0,2	0,18
	Průměr ± SD		223 ± 21	0,5 ± 0,3



Tab. 6: Charakteristiky PLGA nanočástic s komplexem gentamicin sulfátu (GEN-AOT)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	Velikost (nm)	ZP (mV)	PDI
25	1	138	-10,5	0,17
		135	-10,0	0,17
		136	-9,9	0,18
	2	143	-9,3	0,19
		141	-9,8	0,2
		142	-10,3	0,20
	3	143	-10,5	0,20
		144	-10,2	0,22
		143	-9,8	0,21
	Průměr ± SD	141 ± 3	-10,0 ± 0,4	0,19 ± 0,02
50	1	140	-8,6	0,18
		139	-8,9	0,2
		140	-9,0	0,19
	2	139	-9,3	0,17
		139	-9,2	0,18
		140	-9,9	0,18
	3	137	-10,0	0,17
		136	-10,4	0,18
		137	-10,3	0,19
	Průměr ± SD	139 ± 1	-9,5 ± 0,6	0,18 ± 0,01
75	1	143	-7,6	0,2
		143	-7,1	0,2
		143	-7,4	0,2
	2	150	-9,0	0,17
		151	-9,1	0,18
		149	-8,7	0,17
	3	148	-9,0	0,18
		145	-8,4	0,19
		147	-9,3	0,19
	Průměr ± SD	147 ± 3	-8,4 ± 0,8	0,19 ± 0,01
100	1	148	-7,0	0,15
		149	-6,9	0,19
		148	-6,9	0,18
	2	154	-6,5	0,14
		153	-7,0	0,17
		152	-7,4	0,17
	3	158	-7,1	0,18
		158	-7,4	0,16
		157	-7,9	0,16
	Průměr ± SD	153 ± 4	-7,1 ± 0,4	0,17 ± 0,02

Tab. 7: Charakteristiky PLGA nanočástic komplexem vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	Velikost (nm)	ZP (mV)	PDI
25	1	145	-6,6	0,13
		143	-7,4	0,15
		142	-7,4	0,15
	2	166	-6,4	0,12
		165	-6,6	0,14
		166	-7,1	0,14
	3	155	-5,7	0,11
		152	-6,2	0,14
		151	-6,8	0,14
	Průměr ± SD		154 ± 9	-6,7 ± 0,5
50	1	152	-5,5	0,13
		150	-5,7	0,14
		151	-6,0	0,13
	2	175	-6,6	0,11
		176	-7,0	0,12
		175	-6,9	0,13
	3	161	-5,2	0,14
		161	-5,7	0,14
		161	-6,1	0,15
	Průměr ± SD		162 ± 10	-6,1 ± 0,6
75	1	173	-5,1	0,18
		174	-5,6	0,13
		175	-5,6	0,13
	2	187	-6,0	0,12
		185	-6,7	0,14
		185	-6,7	0,15
	3	180	-4,7	0,16
		181	-5,4	0,16
		178	-5,5	0,17
	Průměr ± SD		180 ± 5	-5,7 ± 0,6
100	1	201	-4,4	0,18
		204	-5,4	0,16
		203	-5,3	0,16
	2	199	-3,9	0,18
		197	-4,1	0,17
		198	-4,3	0,17
	3	210	-4,4	0,18
		208	-3,2	0,16
		207	-3,3	0,16
	Průměr ± SD		203 ± 4	-4,3 ± 0,8

## 9.2 EE a LC PLGA nanočástic

Tab. 8: Enkapsulační účinnost gentamicin sulfátu (GEN)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	EE (%)	LC (%)
25	1	1,6	2,6
	2	1,1	0,9
	3	1,1	2,5
	Průměr ± SD	1,3 ± 0,3	2,0 ± 1,0
50	1	0,8	0,4
	2	2,4	1,1
	3	2,9	0,9
	Průměr ± SD	2,0 ± 1,1	0,8 ± 0,4
75	1	1,7	0,3
	2	1,7	0,3
	3	1,1	0,3
	Průměr ± SD	1,5 ± 0,3	0,3
100	1	2,3	0,2
	2	1,4	0,2
	3	1,2	0,2
	Průměr ± SD	1,7 ± 0,6	0,2

Tab. 9: Enkapsulační účinnost komplexu gentamicin sulfátu (GEN-AOT)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	EE (%)	LC (%)
25	1	62,5	45,0
	2	59,3	37,7
	3	71,6	47,7
	Průměr ± SD	64,4 ± 6,4	43,5 ± 5,2
50	1	82,3	13,4
	2	76,3	15,7
	3	82,9	15,8
	Průměr ± SD	80,5 ± 3,6	15,0 ± 1,0
75	1	93,3	17,3
	2	86,2	10,4
	3	85,4	9,9
	Průměr ± SD	88,3 ± 3,6	12,5 ± 4,1
100	1	86,2	10,0
	2	93,7	10,7
	3	90,6	8,0
	Průměr ± SD	90,0 ± 4,0	9,5 ± 1,4

Tab. 10: Enkapsulační účinnost vankomycin hydrochloridu (VAN)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	EE (%)	LC (%)
25	1	7,3	2,6
	2	3,6	1,3
	3	5,1	1,8
	Průměr ± SD	5,4 ± 2,6	1,9 ± 1,0
50	1	4,2	0,8
	2	3,4	0,8
	3	4,0	0,6
	Průměr ± SD	3,9 ± 0,5	0,7 ± 0,1
75	1	4,8	0,6
	2	4,2	0,4
	3	5,4	0,4
	Průměr ± SD	4,8 ± 0,6	0,5 ± 0,1
100	1	5,6	0,4
	2	5,1	0,5
	3	5,5	0,4
	Průměr ± SD	5,3 ± 0,4	0,4 ± 0,1

Tab. 11: Enkapsulační účinnost komplexu vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT)

PLGA-A2 (mg/ml)	№ vzorku	EE (%)	LC (%)
25	1	5,2	2,1
	2	5,2	1,4
	3	5,9	1,6
	Průměr ± SD	5,4 ± 0,4	1,7 ± 0,4
50	1	10,1	1,7
	2	9,7	1,6
	3	9,9	1,6
	Průměr ± SD	9,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1
75	1	11,6	1,5
	2	11,2	1,1
	3	12,1	1,2
	Průměr ± SD	11,7 ± 0,4	1,3 ± 0,1
100	1	13,9	1,1
	2	13,9	1,0
	3	14,3	1,1
	Průměr ± SD	14,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1

## 10 DISKUZE

Nanočástice s VAN a GEN byly připraveny dvojitě-emulzní metodou  $V_1/O/V_2$ .<sup>47,48</sup> Ukázalo se však, že tato léčiva mají nízkou afinitu k polymeru PLGA-A2 kvůli své vysoké hydrofilitě, což má za následek únik léčiv z nanočástic a nízkou enkapsulaci.<sup>72</sup> Pro zvýšení enkapsulační účinnosti VAN a GEN byly formulovány komplexy s anionickým surfaktantem AOT metodou hydrofobního iontového párování (HIP).<sup>63</sup> Na základě předchozích experimentů byly pro přípravu nanočástic zvoleny metody, které poskytují stabilní nanočástice požadovaných vlastností. Pro přípravu NČ s obsahem GEN-AOT byla použita metoda jednoduché emulgace (O/V).<sup>47</sup> Nanočástice s VAN-AOT byly připraveny suspenzně-emulzní metodou (S/O/V).<sup>56</sup> Byl testován vliv formulačních faktorů na velikost, polydisperzitu, zeta potenciál, enkapsulační účinnost a procentuální podíl léčiva v nanočásticích. Pro formulaci nanočástic byl na základě předchozích experimentů zvolen polymer PLGA-A2. Jedná se o kopolymer LA a GA v ekvimolárním množství, větvený na kyselině polyakrylové o molekulové hmotnosti 2000 g/mol, která byla přidána do reakční směsi v koncentraci 2 %.<sup>3</sup> Díky tomu se jedná o větvený polymer s vyšším obsahem terminálních karboxylů ve své struktuře, které by měly snížit hydrofobicitu ve srovnání s lineárními PLGA polymery srovnatelné molární hmotnosti. Charakteristiky polymeru PLGA-A2 jsou uvedeny v Tab. 12.<sup>99</sup>

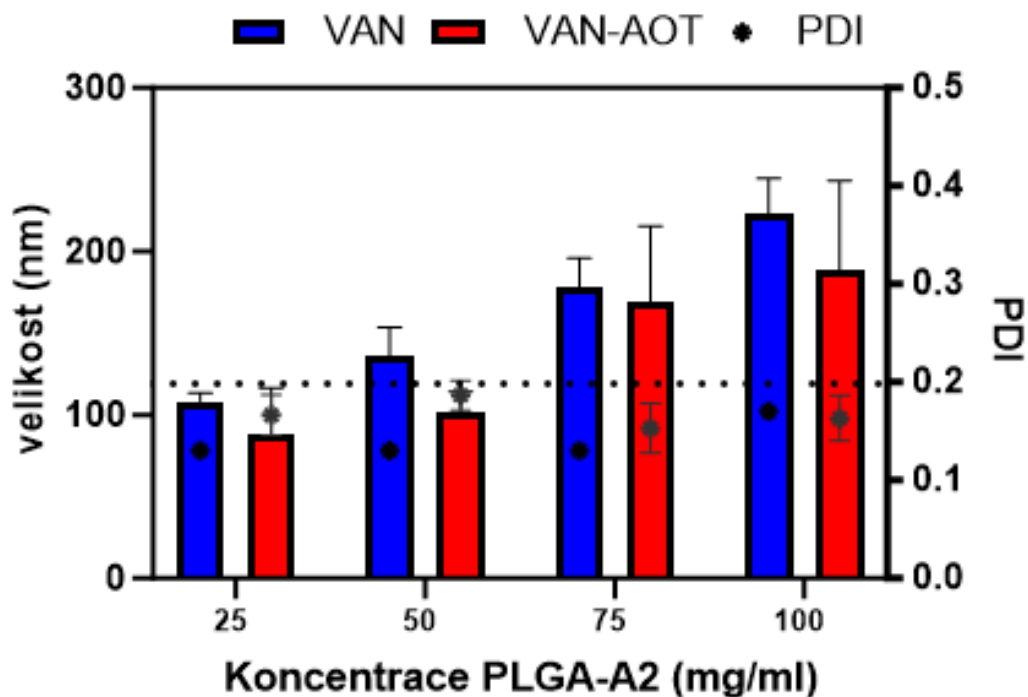
Tab. 12: Číselné ( $M_n$ ) a hmotnostní ( $M_w$ ) průměry molární hmotnosti, hmotnostní průměr vnitřní viskozity  $[\eta]_w$ , větvící poměr  $g'$  a teplota skelného přechodu ( $T_g$ )<sup>99</sup>

Polymer	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)	$[\eta]_w$ (ml/g)	$g'$	$T_g$ (°C)
PLGA-A2	8600	14400	8,9	0,54	32,8

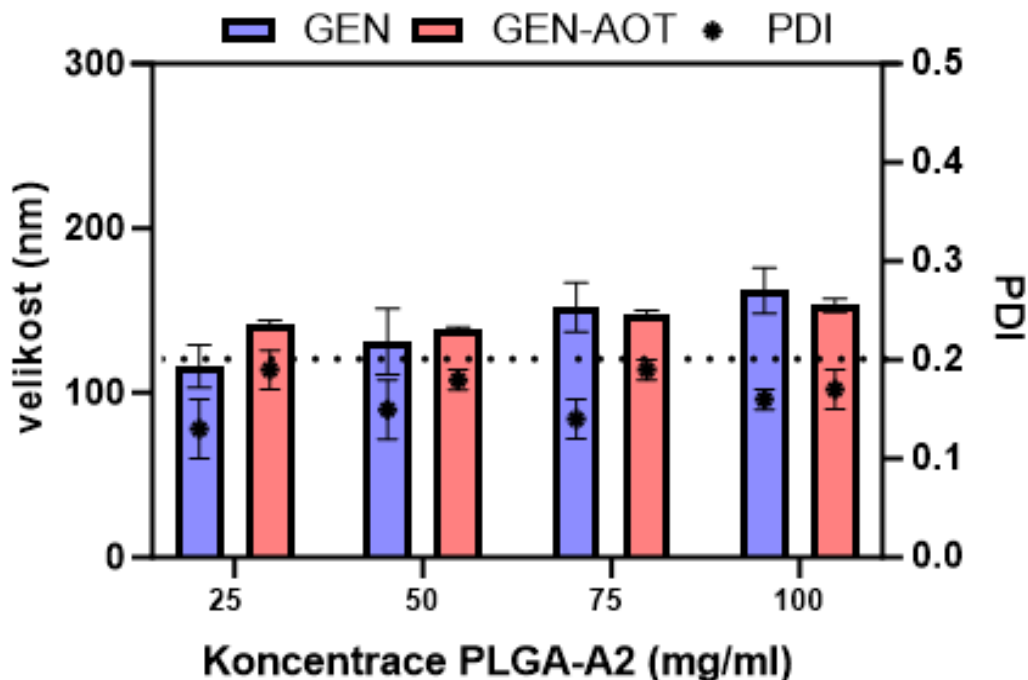
Jako rozpouštědlo pro PLGA-A2 byl zvolen ethyl-acetát, polární aprotické rozpouštědlo, které je monografováno v ČL. Jeho výhodou je vyhovující toxikologický profil ve srovnání s jinými organickými rozpouštědly, používanými v procesech přípravy nanočástic.<sup>47</sup> Jako stabilizátor nanosuspenze byl zvolen Poloxamer 407, což je hydrofilní neiontová povrchově aktivní látka. Poloxamer 407 je blokový kopolymer ethylenoxidu a propylenoxidu. Stabilizuje nanočástice stericky adsorpcí na povrchu nanočástic.<sup>100</sup>

## 10.1 Velikost, polydisperzita a zeta potenciál nanočástic

Byl studován vliv koncentrace polymeru PLGA-A2 na velikost, polydisperzitu a zeta potenciál nanočástic. Velikost nanočástic je také doplněna bezrozměrným indexem polydisperzity (PDI), který vyjadřuje stupeň rozložení velikosti NČ. Soustavy s hodnotami PDI nižšími než 0,1 lze považovat za monodisperzní.<sup>84</sup> Zeta potenciál ovlivňuje stabilitu nanočástic. Nanočástice se zeta potenciálem větším než  $\pm 30$  mV se považují za stabilní, protože povrchový náboj brání agregaci a jiným projevům nestability nanočástic elektrostatickým odpuzováním.<sup>89</sup> Naměřené hodnoty velikosti, PDI a zeta potenciálu jsou uvedeny v Tab. 4–7. Na Obr. 12 je porovnána velikost nanočástic při použití různých koncentrací polymeru u NČ s obsahem VAN a VAN-AOT. Na Obr. 13 je porovnána velikost nanočástic při použití různých koncentrací polymeru PLGA-A2 u NČ s obsahem GEN a GEN-AOT. Byl pozorován nárůst velikosti nanočástic s rostoucí koncentrací polymeru v organické fázi. Zvýšení koncentrace polymeru vede ke zvýšení viskozity organické fáze. Tím se zvyšuje odpor proti smykovému napětí, kterým je homogenizována primární disperze a ve výsledku to vede ke zvětšení velikosti nanočástic. Největší velikost NČ byla naměřena při použití organické fáze tvořené roztokem PLGA-A2 v ethyl-acetátu o koncentraci 100 mg/ml, a naopak nejmenší byly NČ tvořené při koncentraci PLGA-A2 25 mg/ml. NČ s GEN-AOT a VAN-AOT vykazovaly v mnoha případech větší velikost ve srovnání s NČ obsahujícími hydrofilní antibiotika při použití stejné koncentrace polymeru. Velikost nanočástic s VAN a GEN byla v rozmezí přibližně 108 až 223 nm. Velikost nanočástic s VAN-AOT a GEN-AOT byla v rozmezí přibližně 141 až 203 nm. Všechny formulované nanočástice vykazovaly optimální hodnoty PDI, které byly u všech šarží přibližně stejné. Průměrná hodnota PDI byla menší než 0,2.



Obr. 12: Závislost velikosti nanočástic s vankomycin hydrochloridem (VAN) (modré sloupce) a s komplexem vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci PLGA-A2.



Obr. 13: Závislost velikosti nanočástic s gentamicin sulfátem (GEN) (modré sloupce) a s komplexem gentamicin sulfátu (GEN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci PLGA-A2.

Hodnoty zeta potenciálu se pohybují v rozmezí -10 až 0,5 mV (viz Tab. 4–7). Domníváme se, že takto nízké hodnoty mohly být způsobeny právě zvoleným surfaktantem (Poloxamer 407), který stabilizuje nanosuspenzi stericky, nikoli elektrostaticky. Díky své povrchové aktivitě se adsorbuje na povrchu NČ a vytváří polymerní vrstvu, což vede k maskování povrchového náboje.<sup>100</sup> Ve výsledku se to projevuje nižší hodnotou zeta potenciálu. Nicméně připravené nanočástice nelze jednoznačně považovat za nestabilní. Relativně dostatečnou stabilitu připravených NČ potvrzují zjištěné hodnoty PDI a rovněž SEM snímky. Další možnost, jak nanočástice stabilizovat, je jejich uchovávání v lyofilizovaném stavu.<sup>101</sup>

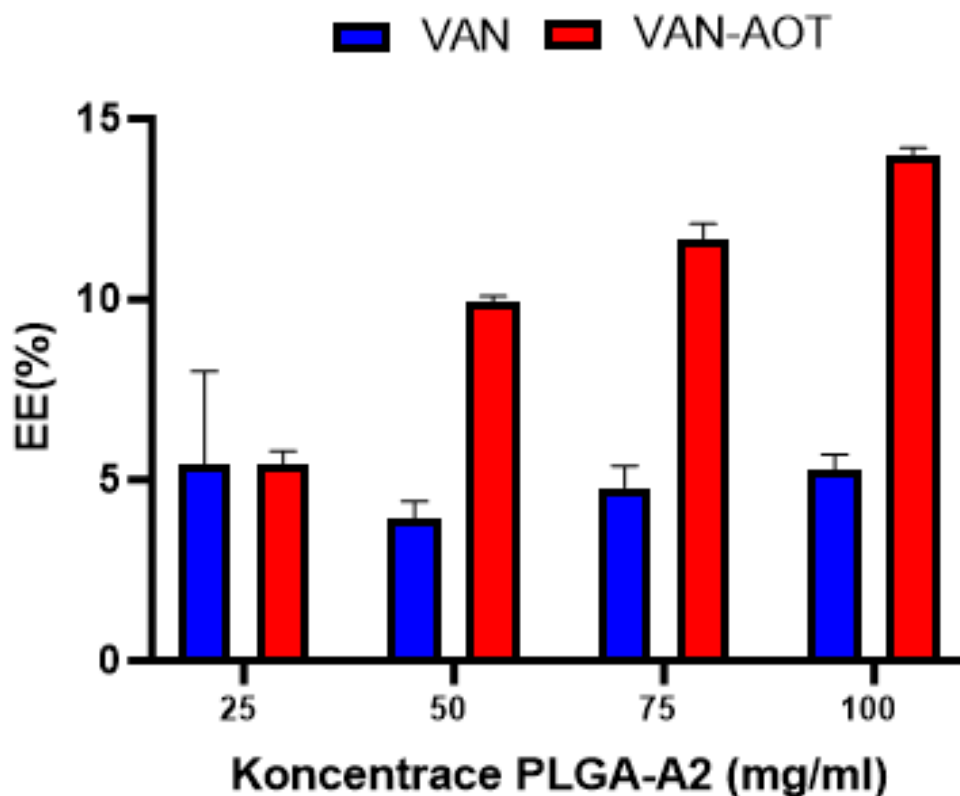
## 10.2 Enkapsulační účinnost a procentuální podíl léčiva v nanočásticích

Enkapsulační účinnost (EE) je procento léčivé látky zachycené v nanočásticích z celkového množství léčiva použitého při jejich přípravě.<sup>102</sup> Procentuální podíl léčiva v nanočásticích neboli *loading capacity* (LC) je podíl léčivé látky zachycené v nanočásticích k celkovému množství nanočástic.<sup>103</sup> Často dochází k záměně těchto pojmů. Je snahou dosáhnout co nejvyšší hodnotu EE, a to nejen z ekologických a ekonomických důvodů, ale také z důvodu vzniku rezistence a snížení účinnosti antibiotik. Na druhou stranu optimální poměr léčiva a polymerního nosiče ve formulovaných nanočásticích je dán zejména požadovaným profilem liberace, požadavkem na stabilitu, cílenou distribuci a výsledný terapeutický účinek.

Pro stanovení EE se obecně používá metoda přímá, kdy se EE vypočítá měřením koncentrace léčiva zachyceného v nanočásticích, a metoda nepřímá, která je stanovena výpočtem koncentrace neenkapsulovaného léčiva v supernatantu.<sup>94</sup> Přesnější hodnoty poskytuje přímá metoda, zatímco metoda nepřímá může vést k falešně vysokým hodnotám EE. V této práci byla enkapsulační účinnost u nanočástic s obsahem hydrofilních antibiotik nebo jejich hydrofobních komplexů připravených z různých koncentrací PLGA-A2 stanovena přímou metodou. Hodnoty EE a LC jsou uvedeny v Tab. 8–11.

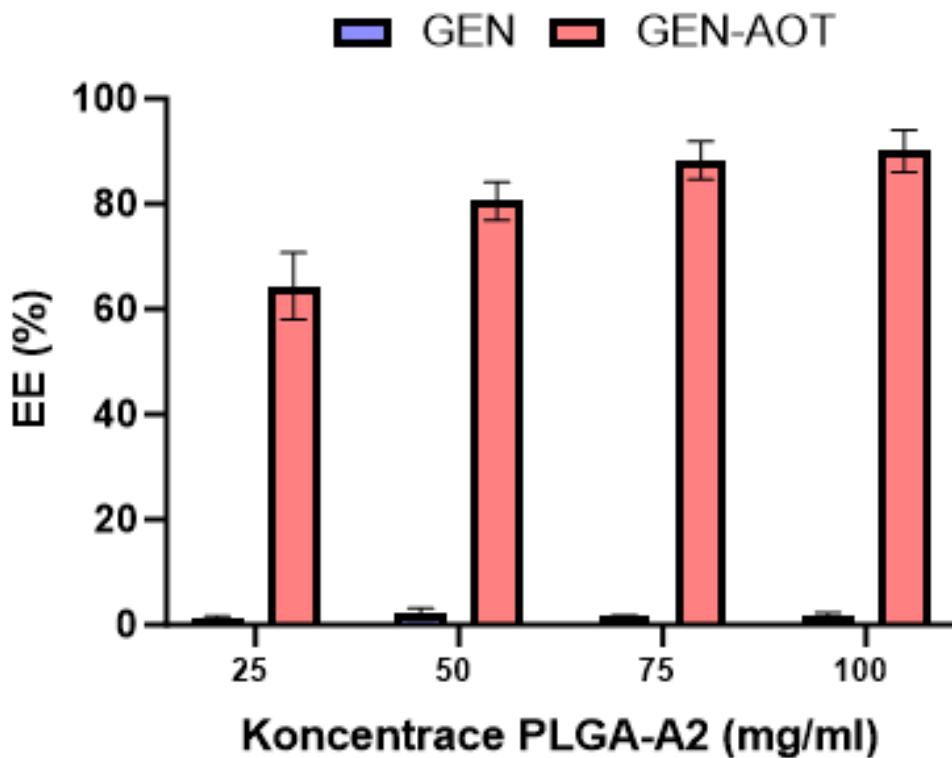
Na Obr. 14 je porovnána enkapsulační účinnost NČ obsahujících VAN nebo VAN-AOT v závislosti na koncentraci PLGA-A2. EE stanovená u nanočástic s obsahem VAN je velmi nízká, a to v rozmezí 3,9 až 5,4 %. EE stanovená u NČ obsahujících VAN-AOT je vyšší, a to v rozmezí 5,4 až 14,0 %.





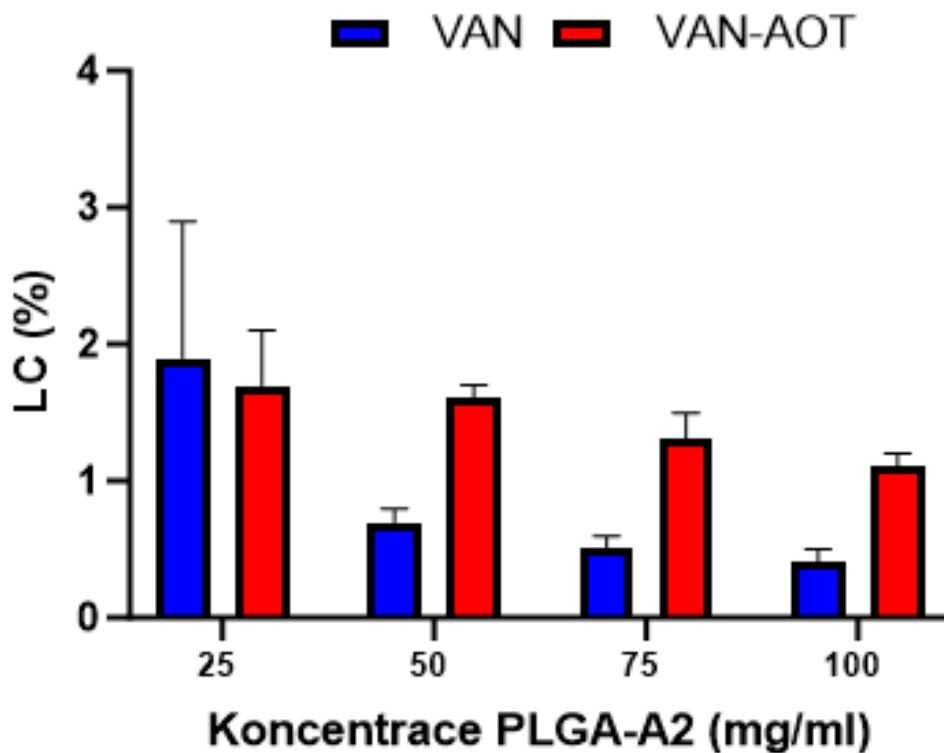
Obr. 14: Závislost enkapsulační účinnosti (EE) (%) nanočástic s vankomycin hydrochloridem (VAN) (modré sloupce) nebo s komplexem vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci polymeru PLGA-A2.

Na Obr. 15 je porovnána enkapsulační účinnost NČ obsahujících GEN nebo GEN-AOT v závislosti na koncentraci PLGA-A2. EE stanovená u nanočástic s obsahem GEN je v rozmezí 1,3 až 1,7 %. EE stanovená u NČ obsahujících GEN-AOT je významně vyšší, a to v rozmezí 64,4 až 90,0 %.



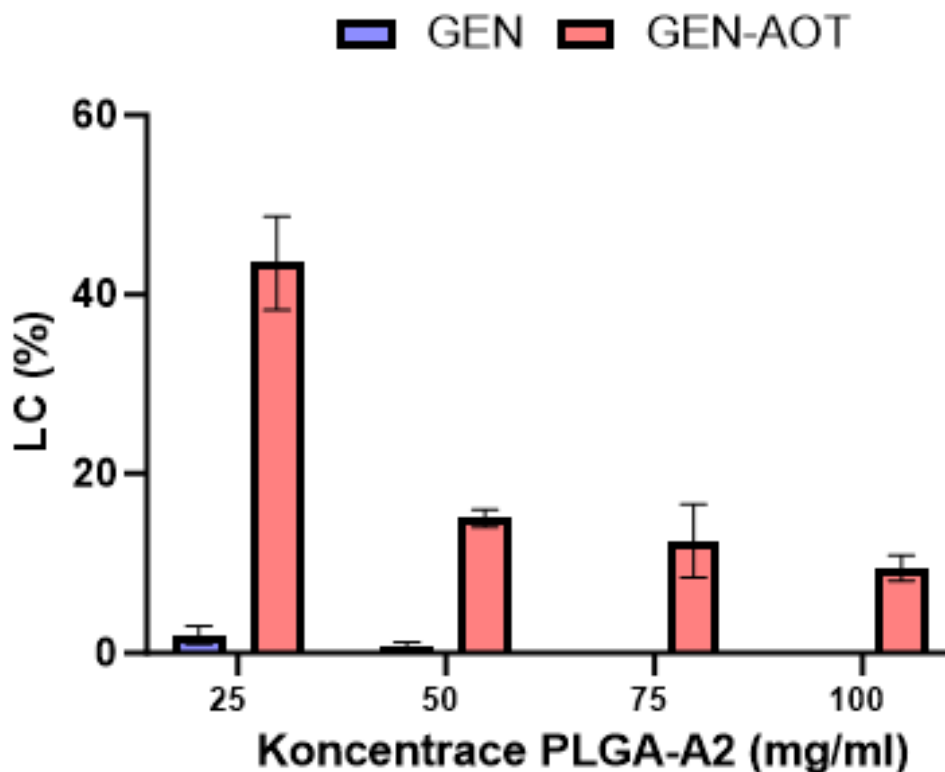
Obr. 15: Závislost enkapsulační účinnosti (EE) (%) nanočástic s gentamicin sulfátem (GEN) (modré sloupce) nebo s komplexem gentamicin sulfátu (GEN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci polymeru PLGA-A2.

Na Obr. 16 je porovnán procentuální podíl léčiva (LC) NČ obsahujících VAN nebo VAN-AOT v závislosti na koncentraci PLGA-A2. LC stanovená u nanočástic s obsahem VAN je v rozmezí 0,4 až 1,9 %. LC stanovená u NČ obsahujících VAN-AOT je v rozmezí 1,1 až 1,7 %.



Obr. 16: Závislost procentuálního podílu léčiva (LC) (%) nanočástic s vankomycin hydrochloridem (VAN) (modré sloupce) nebo s komplexem vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci polymeru PLGA-A2.

Na Obr. 17 je porovnán procentuální podíl léčiva (LC) u NČ obsahujících GEN nebo GEN-AOT v závislosti na koncentraci PLGA-A2. LC stanovená u nanočástic s obsahem GEN je v rozmezí 0,2 až 2,0 %. LC stanovená u NČ obsahujících GEN-AOT je v rozmezí 9,5 až 43,5 %.



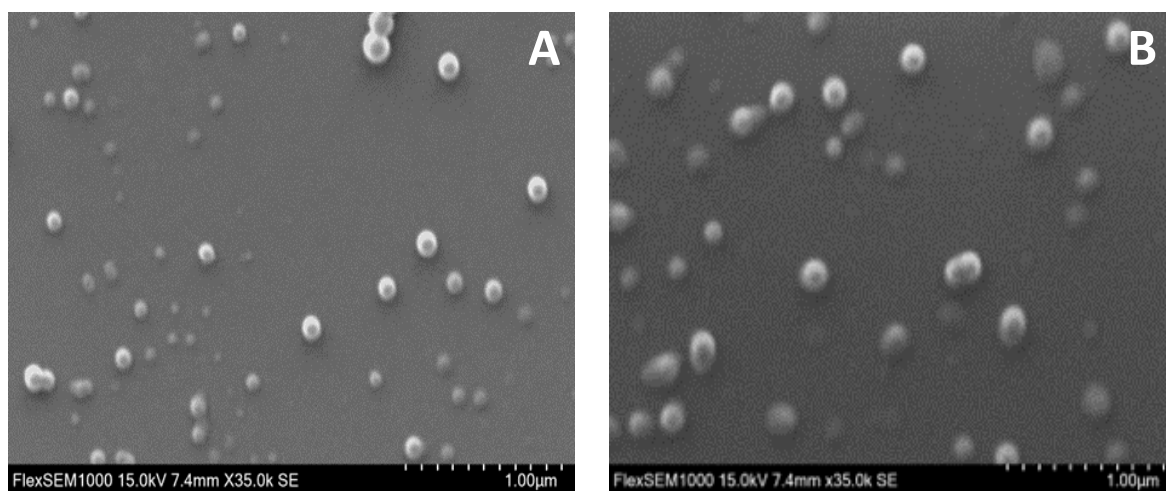
Obr. 17: Závislost procentuálního podílu léčiva (LC) (%) nanočástic s gentamicin sulfátem (GEN) (modré sloupce) nebo s komplexem gentamicin sulfátu (GEN-AOT) (červené sloupce) na koncentraci polymeru PLGA-A2.

Byl zjištěn vliv množství polymeru PLGA-A2 použitého při přípravě nanočástic na EE a LC. Ve většině případů enkapsulační účinnost byla nejvyšší u nanočástic připravených při použití organické fáze s koncentrací PLGA-A2 100 mg/ml. Výjimku tvořily NČ s obsahem VAN, u kterých největší hodnotu EE vykazovaly NČ připravené při koncentraci PLGA-A2 25 mg/ml. Výjimkou byly také NČ obsahující GEN, u kterých největší hodnotu EE vykazovaly NČ připravené při koncentraci PLGA-A2 50 mg/ml.

Nízká EE a LC nanočástic s VAN a GEN je způsobena jejich vysokou hydrofilitou a nízkou afinitou k PLGA-A2. Naopak NČ s obsahem VAN-AOT a GEN-AOT vykazují mnohem vyšší EE a LC kvůli vyšší hydrofobnosti těchto komplexů a jejich vyšší afinitě k polymernímu nosiči.<sup>72</sup> NČ obsahující VAN-AOT však mají nižší hodnoty EE a LC ve srovnání s NČ obsahujícími GEN-AOT pravděpodobně kvůli tomu, že molekula VAN má větší velikost a menší počet skupin, které reagují s AOT. Proto komplex VAN-AOT ve srovnání s komplexem GEN-AOT je více hydrofilní a nemá dostatečnou afinitu k PLGA-A2, aby došlo ke kompletnímu zapouzdření léčiva.

### 10.3 SEM

Morfologie studovaných nanočástic byla ověřena pomocí skenovací elektronové mikroskopie v režimu sekundárních elektronů v urychlovacím napětí 15 kV. Byla nutná opatrnost, protože po určité době paprsek elektronů při vyšších úrovních urychlovacího napětí vytvářel vysokou energii, což vzorky ničilo. Na snímkách se zobrazoval sférický tvar (Obr. 18). Velikost jednotlivých nanočástic byla určena pomocí softwarového vyhodnocení a výsledky podstatně korelovaly s výsledky získanými pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS).



*Obr. 18: SEM snímky PLGA-A2 nanočástic s obsahem hydrofobního komplexu vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) (A) a hydrofobního komplexu gentamicin sulfátu (GEN-AOT) (B). Zvětšení 35000×.*

## 11 ZÁVĚR

Polymerní nanočástice PLGA-A2 s hydrofilními antibiotiky VAN a GEN a jejich hydrofobními komplexy VAN-AOT a GEN-AOT byly formulovány různými metody s ohledem na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Z důvodu různé rozpustnosti léčivých látek nebo jejich komplexů v organickém rozpouštědle a ve vodě nebylo možno pro přípravu nanočástic použít stejnou metodu. Pro přípravu nanočástic s obsahem VAN a GEN byla zvolena dvojitě-emulzní metoda ( $V_1/O/V_2$ ). Nanočástice s obsahem GEN-AOT byly připraveny metodou jednoduché emulgace (O/V). Vzhledem k tomu, že rozpustnost komplexu VAN-AOT v ethyl-acetátu je nízká, byla zvolena suspenzně-emulzní metoda (S/O/V).

Byl studován vliv koncentrace polymeru PLGA-A2 na velikost NČ. Velikost připravených nanočástic byla v rozmezí 108 až 223 nm a byl pozorován nárůst velikosti NČ v závislosti se zvyšující se koncentrací polymeru. Index polydisperzity (PDI), stanovený pomocí Zetasizeru, byl u všech vzorků optimální a vykazoval hodnoty menší než 0,2. Nízké hodnoty zeta potenciálu byly spojené s použitím neionogenního surfaktantu Poloxamer 407, který stericky stabilizoval NČ. Snímky SEM potvrdily sférický tvar nanočástic.

Nízká enkapsulační účinnost (EE) byla způsobena hydrofilní povahou VAN a GEN, kdy velká část léčiva uniká z NČ do vnější vodní fáze během přípravy nanočástic. Vysoká enkapsulační účinnost byla dosažena u NČ obsahujících komplex GEN-AOT. V tomto případě byla nejvyšší hodnota EE 90 %. Enkapsulační účinnost NČ obsahujících VAN-AOT byla vyšší než u NČ obsahujících VAN, nicméně nejvyšší hodnota EE byla pouze 14 %. Takto nízká hodnota enkapsulace pravděpodobně souvisí s tím, že komplex vankomycin hydrochloridu (VAN-AOT) je i po hydrofobním iontovém párování málo hydrofobní.

V dalších experimentech by bylo vhodné se zaměřit na nízkou enkapsulační účinnost VAN-AOT, například použitím jiného surfaktantu nebo jiné metody přípravy NČ. Také by bylo přínosné provést studie, které by se týkalo liberace hydrofobních komplexů léčiv z NČ a jejich stability.

## 12 LITERATURA

1. PETRÁŠOVÁ, I. Formulace PLGA nanočástic s vankomycinem pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí I. Diplomová práce, 2023, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.
2. 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.
3. KOZÁČKOVÁ, D. Polymerní částice pro cílenou terapii a zvýšení biodostupnosti. Diplomová práce, 2022, Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie. Vedoucí práce PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.
4. KOLINSKY, D.C., LIANG, S.Y. 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.
5. TURECKI, M.B., TALJANOVIC, M.S., STUBBS, A.Y. et al. Imaging of musculoskeletal soft tissue infections. *Skeletal Radiology* [online]. 2010, **39**(10), 957–71. ISSN: 0364-2348. Dostupné z: doi 10.1007/s00256-009-0780-0.
6. CHRISTIAN, S., KRAAS, J., CONWAY, W.F. Musculoskeletal infections. *Semin Roentgenol* [online]. 2007, **42**(2), 92–101. ISSN 0037-198X. Dostupné z: doi 0.1053/j.ro.2006.08.011.
7. WANG, J., WANG, L. Novel therapeutic interventions towards improved management of septic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* [online]. 2022, **22**(1), 530. Dostupné z: doi 10.1186/s12891-021-04383-6.
8. MADER, J.T., WANG, J., CALHOUN, J.H. Antibiotic Therapy for Musculoskeletal Infections. *The Journal of Bone & Joint Surgery* [online]. 2001, **83**(12), 1878–1890. ISSN: 0021-9355. Dostupné z: doi: 10.2106/00004623-200112000-00017
9. JARAMLO-DE LA TORRE, J.J., BOHINSKI, R.J., KUNTZ, C. Vertebral osteomyelitis. *Neurosurgery Clinics of North America* [online]. 2006, **17**, 339–351. ISSN 1042-3680. Dostupné z: doi: 10.1016/j.nec.2006.05.003.
10. CHEUNG, W.Y, LUK, K.D. Pyogenic spondylitis. *Int Orthop* [online]. 2012, **36**(2), 397–404. ISSN: 2690-9189. Dostupné z: doi:10.1007/s00264-011-1384-6.

11. MANYI-LOH, C., MAMPHWELI, S., MEYER, E., OKOH, A. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* [online]. 2018, **23**(4), 795. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi 10.3390/molecules23040795
12. KISS, C., CONNOLEY, D., CONOLLY, K. et al. Long-Term Outcomes in Patients on Life-Long Antibiotics: A Five-Year Cohort Study. *Antibiotics Basel* [online]. 2022, **11**(1), 62. ISSN 2079-6382. Dostupné z doi: 10.3390/antibiotics11010062.
13. LEE, T., PANG, S., ABRAHAM, S., COOMBS, G.W. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist* [online]. 2019, **16**, 36–47. ISSN 2213-7183. Dostupné z: doi 10.1016/j.jgar.2018.08.016.
14. Vancomycin. Dostupné z: [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com)
15. WILHELM, M.P. Vancomycin. *Mayo Clin Proc* [online]. 1991, **66**(11):1165–1170. ISSN 1942-5546. Dostupné z: doi 10.1016/s0025-6196(12)65799-1.
16. GHASEMYEH, P., VAZIN, A., ZAND, F. et al. Pharmacokinetic assessment of vancomycin in critically ill patients and nephrotoxicity prediction using individualized pharmacokinetic parameters. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2022, **13**. ISSN 1663-9813. Dostupné z: doi 10.3389/fphar.2022.912202.
17. PHILLIPS, I., EYKYN, S., KING, B.A. et al. The in vitro antibacterial activity of nine aminoglycosides and spectinomycin on clinical isolates of common Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* [online]. 1977, **3**(5), 403–410. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi 10.1093/jac/3.5.403.
18. Gentamicin. Dostupné z: [https://en.m.wiktionary.org/wiki/File:Gentamicin\\_Structure.svg](https://en.m.wiktionary.org/wiki/File:Gentamicin_Structure.svg)
19. BEGANOVIC, M., LUTHER, M.K., RICE, L.B. et al. A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis* [online]. 2018, **67**(2), 303–309. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi 10.1093/cid/ciy064.
20. SUCHOPÁR, J. *Compendium*. 5. vyd. B.m.: Panax, 2018. ISBN 978-80-902806-7-0.
21. ZAZO, H., LAGAREJOS, E. et al. Physiologically-based pharmacokinetic modelling and dosing evaluation of gentamicin in neonates using PhysPK. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2022, **13**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi 10.3389/fphar.2022.977372.



22. SHICHAO, Z., MALCOLM, X., BINGYUN, L. Recent advances in musculoskeletal local drug delivery. *Acta Biomaterialia* [online]. 2019, **93**, 135–151. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi 10.1016/j.actbio.2019.01.043.
23. HANSSEN, A. Local Antibiotic Delivery Vehicles in the Treatment of Musculoskeletal Infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [online]. 2005, **437**, 91–96. ISSN 1528-1132. Dostupné z: doi 10.1097/01.blo.0000175713.30506.77.
24. KANELLAKOPOULOU, K., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J. Carrier Systems for the Local Delivery of Antibiotics in Bone Infections. *Drugs* [online]. 2000, **59**, 1223–1232. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi 10.2165/00003495-200059060-00003.
25. HANSSEN, A., SPANGHEHL, M. Practical Applications of Antibiotic-Loaded Bone Cement for Treatment of Infected Joint Replacements. *Clinical Orthopaedics and Related Research* [online]. 2004, **427**, 79–85. ISSN 1528-1132. Dostupné z: doi 10.1097/01.blo.0000143806.72379.7d.
26. PENNER, M.J., MASRI, B.A., DUNCAN, C.P. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty* [online]. 1996, **11**, 939–944. ISSN 1532-8406. Dostupné z: doi 10.1016/s0883-5403(96)80135-5.
27. ROBERTS, T.T., ROSENBAUM, A.J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* [online]. 2012, **8**(4), 114–24. ISSN 15447-6278. Dostupné z: doi 10.4161/org.23306.
28. BAUER, T.W., MUSCHLER, G.F. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000, **371**, 10–27. ISSN 1528-1132.
29. DORON, I.I., AMY, L.L. Bone graft substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 2002, **9**(4), 151–160. ISSN 1071-0949. Dostupné z: doi 10.1053/j.otpr.2003.09.003.
30. OGAY, V., MUN, E.A., KUDAIBERGEN, G. et al. Progress and Prospects of Polymer-Based Drug Delivery Systems for Bone Tissue Regeneration. *Polymers* [online]. 2020, **12**, 2881. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi 10.3390/polym12122881.
31. BEVERLEY, T., CAMERON, A. Synthetic polymers as drugs and therapeutics. *J Mater Chem* [online]. 2005, **15**, 441–455. ISSN 2050-7488. Dostupné z: doi 10.1039/b410799n.
32. IQBAL, N., KHAN, A.S., ASIF, A. et al. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: A critical review. *Int. Mater. Rev* [online]. 2019, **64**, 91–126. ISSN 0950-6608. Dostupné z: doi 10.1080/09506608.2018.1460943.

33. RAHUL, S., KALHAPURE, N.S. et al. Nanoengineered Drug Delivery Systems for Enhancing Antibiotic Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **104**(3), 872–905. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi 10.1002/jps.24298.
34. HANS, M.L., LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* [online]. 2002, **6**(4), 319–327. ISSN 1359-0286. Dostupné z: doi 10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
35. MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers. Basel.* 2011, **3**(3), 1377–1397. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi 10.3390/polym3031377.
36. HOUCHIN, M.L., TOPP, E.M. Physical properties of PLGA films during polymer degradation. *J of Applied Polymer.* 2009, **114**(5), 2849–2853. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi 10.1002/app.30813.
37. DADWAL, M. Polymeric Nanoparticles as Promising Novel Carriers for Drug Delivery: An Overview. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research.* 2014, **4**(1), 20–30. ISSN 2249-3379.
38. *Liposome Nanoparticle | Liposome Monitoring* [online]. Dostupné z: <https://www.inprocess-lsp.com/liposomes/>
39. SERCOMBE, L., VEERATI, T., MOHEIMANI, F. et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2015, **6**, 1–13. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi 10.3389/fphar.2015.00286.
40. KUMARESH, S., SOPPIMATH, T., ANANDRAO, R.K., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, **70**(1,2), 1–20. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi 10.1016/S0168-3659(00)00339-4.
41. GHASEMIYEH, P., MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci* [online]. 2018, **13**(4), 288–303. ISSN 1735-9414. Dostupné z: doi 10.4103/1735-5362.235156.
42. HELGASON, T., AWAD, T.S., KRISTBERGSSON, K., MCCLEMENTS, D.J., WEISS J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2009; **334**, 75–81. ISSN 1095-7103. Dostupné z: doi 10.1016/j.jcis.2009.03.012.

43. EKAMBARAM, P., SATHALI, A.H., PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. Scientific Review. *Chemical Communications*. 2012, **2**(1), 80–102. ISSN 2277-2669.
44. RAJESH, T., RAHUL, B.C., DINESH, K. et al. Micellar carriers for the delivery of multiple therapeutic agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **135**, 291–308. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi 10.1016/j.colsurfb.2015.07.046.
45. NEGUT, I., BITA, B. Polymeric Micellar Systems—A Special Emphasis on “Smart” Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2023, **15**(3), 976. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi 10.3390/pharmaceutics15030976.
46. SUTTON, D., NASONGKLA, N., BLANCO, E. et al. Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharm Res* [online]. 2007, **24**, 1029–1046. ISSN 2456-9119. Dostupné z: doi 10.1007/s11095-006-9223-y.
47. CARLOS, E., SABLIOV, C.M. 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.
48. HANS, M.L, LOWMAN, A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, **6**(4), 319–327. ISSN 1359-0286. Dostupné z: doi 10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
49. POSADOWSKA, U., BRZYCHCZY-WLOCH, M., PAMULA, E. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. *J Mater Sci Mater Med* [online]. 2016, **27**(1), 9. ISSN 1543-4838. Dostupné z: doi: 10.1007/s10856-015-5604-2.
50. VYSLOUŽIL, J. et al. Příprava léčivých mikročastic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*. 2013, **107**(1), 16–23.
51. ZIELIŃSKA-JUREK, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* [online]. 2020, **25**(16), 3731. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25163731.
52. WANG, Y., PUWANG, T. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*. 2016, **6**, 26. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi 10.3390/nano6020026.
53. BLANCO, M.D, ALONSO, M.J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics*

- and Biopharmaceutics* [online]. 1997, **43**(3), 287–294. ISSN 0939-6411, Dostupné z: doi 10.1016/S0939-6411(97)00056-8.
54. LEAL-CALDERON, F., BIBETTE, J., SCHMITT, V. Double Emulsions. *Emulsion Science* [online]. 2007, 173–199. ISBN 978-0-387-39682-8. Dostupné z: doi 10.1007/978-0-387-39683-5\_7.
55. LIU, G., XIGENG, F., WEI, C. Porous PLGA Microspheres Effectively Loaded with BSA Protein by Electrospraying Combined with Phase Separation in Liquid Nitrogen. *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering* [online]. 2010, **6**, 1–18. ISSN 662-100X. Dostupné z: doi 10.4028/www.scientific.net/JBBTE.6.1.
56. SAWANT, A., KAMATH, S., KULYADI, G.P. 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.
57. GOODARZI, F., ZENDEHBOUDI, S. A Comprehensive review on emulsions and emulsion stability in chemical and energy industries. *Can J Chem Eng* [online]. 2019, **97**(1), 281–309. ISSN 1939-019X. Dostupné z: doi 10.1002/cjce.23336.
58. MILADI, K., SFAR, S., FESSI, H., ELAISSARI, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines* [online]. 2016, 17–53. ISBN 978-3-319-41419-5. Dostupné z: doi 10.1007/978-3-319-41421-8\_2.
59. HORNIG, S., Heinze, T., BECER, R.C., SCHUBERT, S.U. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *J Mater Chem* [online]. 2009, **19**, 3838–3840. ISSN 2050-7488. Dostupné z: doi 10.1039/b906556n.
60. ABDELGHANY, S.M., QUINN, D.J., INGRAM, R.J et al. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine* [online]. 2012, **7**, 4053–4063. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi 10.2147/IJN.S34341.
61. ZWEERS, M.L., ENGBERS, G.H., GRIJPMAN, D.W., FEIJEN, J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *J Control Release* [online]. 2004, **100**(3), 347–356. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi 10.1016/j.jconrel.2004.09.008.
62. ASTETE, C.E., KUMAR, C.S.S.R., SABLIOV, C.M. Size control of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide)-magnetite

- nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique. *Colloid. Surfaces A Physicochem. Eng. Asp* [online]. 2007, **299**, 209–216. ISSN 0927-7757. Dostupné z: doi 10.1016/j.colsurfa.2006.11.055.
63. RISTROPH, K.D., PRUD'HOMME, R.K. Hydrophobic ion pairing: encapsulating small molecules, peptides, and proteins into nanocarriers. *Nanoscale Adv* [online]. 2019, **1**(11), 4207–4237. ISSN 2516-0230. Dostupné z: doi 10.1039/c9na00308h.
64. KWIECIEŃ, K., BRZYCHCZY-WŁOCH, M., PAMUŁA, E. Antibiotics modified by hydrophobic ion-pairing – A solution world's problems with resistant bacteria? *Sustainable Materials and Technologies* [online]. 2023, **37**, 1–13. ISSN 2214-9937. Dostupné z: doi 10.1016/j.susmat.2023.e00662.
65. WIBEL, R., KNOLL, P., LE-VINH, B., KALI, G., BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Synthesis and evaluation of sulfosuccinate-based surfactants as counterions for hydrophobic ion pairing. *Acta Biomater* [online]. 2022, **144**, 54–66. ISSN 2333-7921. Dostupné z: doi 10.1016/j.actbio.2022.03.013.
66. ZIELIŃSKA-JUREK, A., NADOLNA, J., GRABOWSKA, E., ZALESKA-MEDYNSKA, A. Nanoparticles Preparation Using Microemulsion Systems. *Microemulsions – An Introduction to Properties and Applications* [online]. 2012, 229–250. ISBN 978-953-51-0247-2. Dostupné z: doi 10.5772/2300.
67. Docusate sodium. Dostupné z: www.sk.vwr.com.
68. ALAZAR, N., GHEBREMESKEL, C.V., MAYUR, L. Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: Selection of polymer–surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, **328**(2), 119–129. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi 10.1016/j.ijpharm.2006.08.010.
69. VERMA, P., SAHA, R., MITRA, R., PAL, S. Slow water dynamics at the surface of macromolecular assemblies of different morphologies. *Soft Matter* [online]. 2010, **6**, 5971–5979. ISSN 1744-6848. Dostupné z: doi 10.1039/C0SM00188K.
70. YANG, Q. et al. Antibiotics: an overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods, *Bioengineered* [online]. 2021, **12** (1), 7376–7416. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi 10.1080/21655979.2021.1974657.
71. McEWEN, S.A., COLLIGNON, P.J. Antimicrobial resistance: A one health perspective. *Microbiol Spectr* [online]. 2018, **6**(2), 521–547. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.

72. IMBULUZQUETA, E. et al. Novel bioactive hydrophobic gentamicin carriers for the treatment of intracellular bacterial infections, *Acta Biomater* [online]. 2011, **7**(4), 1599–1608. ISSN 2333-7921. Dostupné z: doi 10.1016/j.actbio.2010.11.031.
73. IMBULUZQUETA, E. et al. Hydrophobic gentamicin-loaded nanoparticles are effective against *Brucella melitensis* infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother* [online]. 2013, **57**(7), 3326–3333. ISSN 1098-6596. Dostupné z: doi 10.1128/AAC.00378-13.
74. KASHI, T.S., ESKANDARION, S., ESFANDYARI-MANESH, M. et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int J Nanomedicine* [online]. 2012, **7**, 221–234. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi 10.2147/IJN.S27709.
75. HILL, M., CUNNINGHAM, R.N., HATHOUT, R.M., JOHNSTON, C. et al. Formulation of Antimicrobial Tobramycin Loaded PLGA Nanoparticles via Complexation with AOT. *J Funct Biomater* [online]. 2019, **10**(2), 26. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi 10.3390/jfb10020026.
76. HOLMKVIST, A.D., FRIBERG, A., NILSSON, U.J., SCHOUENBORG, J. Hydrophobic ion pairing of a minocycline/Ca(2+)/AOT complex for preparation of drug-loaded PLGA nanoparticles with improved sustained release. *Int J Pharm* [online]. 2016, **499**(1-2), 351–357. ISSN 2394-1502. Dostupné z: doi 10.1016/j.ijpharm.2016.01.011.
77. LIN, P.S., LIN, P.C., WANG, R.S. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, **32**(4), 711–726. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
78. STEFANOS, M., ROGER, M.P., NGUYEN, T.K.T. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* [online]. 2018, **10**, 871–934. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi 10.1039/c8nr02278j.
79. YETISGIN, A.A, CETINEL, S., ZUVIN, M., KOSAR, A., KUTLU, O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules* [online]. 2020, **25**(9), 2193. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi 10.3390/molecules25092193.
80. CALZOLAI, L., GILLILAND, D., ROSSI, F. Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review. *Food Additives & Contaminants*. 2012, **29**(8), 1183–1193. ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi 10:1080/19440049.2012.689777.
81. SATINDER K., BRAR, M.V. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, **30**(1), 4–17. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi 10.1016/j.trac.2010.08.008.

82. ŠEVČÍKOVÁ, P. et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*, 2014, **108**(5), 479–482.
83. YOUSRY, C. 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 0928-0987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2017.01.013
84. RATNA, T., SCHULZE, P., QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. *Particuology* [online]. 2010, **8**(3), 279–285. ISSN 1674-2001. Dostupné z: doi 10.1016/j.partic.2010.01.003.
85. PING-CHANG, L., STEPHEN, L., PAUL, C.W., RAJAGOPALAN, S. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, **32**(4), 711–726. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
86. LIBO, W., JIAN, Z., WIWIK, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2011, **63**(6), 456–469. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi 10.1016/j.addr.2011.02.001.
87. YUJIN, H., JAE-KEUN, L., JONG-KU, L. Production and dispersion stability of nanoparticles in nanofluids. *Powder Technology* [online]. 2008, **186**(2), 145–153. ISSN 0032-5910. Dostupné z: doi 10.1016/j.powtec.2007.11.020.
88. SMITH, M.C., CRIST, R.M., CLOGSTON J.D., MCNEIL S.E. 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.
89. CLOGSTON, J.D., PATRI, A.K. Zeta Potential Measurement. *Methods Mol Biol* [online]. 2011, **697**, 63–70. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-198-1\_6.
90. POWERS, K.W., PALAZUELOS, M., MOUDGIL, B.M., ROBERTS, S.M. Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies. *Nanotoxicology* [online]. 2007, **1**(1), 42–51. ISSN 1743-5404. Dostupné z: doi 10.1080/17435390701314902.
91. RAMOHLOLA, K.E., IWUOHA, E.I., HATO, M.J., MODIBANE, K.D. 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.

92. MINUTI, A.E., LABUSCA, L., HEREA, D.D., STOIAN, G., CHIRIAC, H., LUPU N.A. Simple Protocol for Sample Preparation for Scanning Electron Microscopic Imaging Allows Quick Screening of Nanomaterials Adhering to Cell Surface. *Int J Mol Sci* [online]. 2022, **24**(1), 430. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi 10.3390/ijms24010430.
93. MODENA, M.M., RÜHLE, B., BURG, T.P., WUTTKE, S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials* [online]. 2019, **31**(32), 1–26. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi 10.1002/adma.201901556.
94. AMINI, Y., AMEL, J.S., SADRI, K. et al. Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Biomed Mater Eng.* 2017, **28**(6), 613–620. ISSN 0959-2989. Dostupné z: doi 10.3233/BME-171705.
95. ZHENG, C., LIANG W., YU, H., CHEN, H. Evaluation of different methods to determine the loading of proteins in PLGA microspheres. *Die Pharmazie* [online]. 2004, **59**(3), 232–233. ISSN 0031-7144. Dostupné z: doi10.3233/BME-171705.
96. CHENG, X, MA, J., SU, J. An Overview of Analytical Methodologies for Determination of Vancomycin in Human Plasma. *Molecules* [online]. 2022, **27**(21), 7319. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi 10.3390/molecules27217319.
97. WANG, R., FAN, S., WANG, R. et al. Determination of aminoglycoside antibiotics by a colorimetric method based on the aggregation of gold nanoparticles. *Nano.* 2013, **8**(4), 1–23. ISSN 2160-0104. Dostupné z: doi 10.1142/S1793292013500379.
98. ROTMAN, S.G., THOMPSON, K., GRIJPMAN, D.W., RICHARDS, R.G., MORIARTY, T.F., EGLIN, D., GUILLAUME, O. Development of bone seeker-functionalised microspheres as a targeted local antibiotic delivery system for bone infections. *J Orthop Translat* [online]. 2019, **21**, 136–145. ISSN 2214-031X. Dostupné z: doi 10.1016/j.jot.2019.07.006.
99. ŠNEJDROVA, E., PODZIMEK, Š, MARTIŠKA, J., HOLAS, O., DITTRICH, M. 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.
100. DUMORTIER, G., GROSSIORD, J.L., AGNELY, F., CHAUMEIL, J.C. A review of Poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* [online]. 2006, **23**(12), 2709–2728. ISSN 2456-9119. Dostupné z: doi 10.1007/s11095-006-9104-4.
101. ZAKERI-MILANI, P., LOVEYMI, B.D., JELVEHGARI, M., VALIZADEH, H. 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 0927-7765. Dostupné z: doi 10.1016/j.colsurfb.2012.10.021.
102. KITA, K., DITTRICH, C. 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
103. MASSELLA, D., CELASCO, E., SALAÜN, F., FERRI, A., BARRESI, A.A. 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.