UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

Formulace a charakterizace emulzí typu v/o pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Šnejdrová Eva, Ph.D.

Hradec Králové 2022 Štěpánka Vedralová

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

Hradec Králové 9. 5. 2022 Štěpánka Vedralová

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení a čas věnovaný konzultacím. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci Doc. MUDr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. a MUDr. Liboru Prokešovi z ortopedické kliniky FN HK, PharmDr. Janě Malákové, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK a Mgr. Janu Loskotovi, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty UHK a MUDr. Tomáši Soukupovi, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Obsah

Abstrakt 6

Abstract 7

1 Zadání práce 8

2 Úvod 9

3 Seznam zkratek 10

4 Teoretická část 11

4.1 Prevence a léčba muskuloskeletálních infekcí 11

4.1.1 Kostní cement 12

4.1.2 Úprava implantátu 14

4.1.3 Kostní štěpy 16

4.2 Emulze 18

4.2.1 Definice 18

4.2.2 Příprava emulzí 18

4.2.3 Stabilita emulzí a stabilizace 20

4.3 Emulze typu v/o pro parenterální aplikace 25

4.4 Analýza tokových vlastností 27

5 Experimentální část 32

5.1 Použité suroviny 32

5.2 Použité přístroje a pomůcky 32

5.3 Přehled vzorků 33

5.4 Postup přípravy emulzí 34

5.4.1 Emulze stabilizované magnesium-stearátem a polyglyceryl-3 polyricinoleátem 34

5.4.2 Emulze stabilizované lecitinem a sorbitan monooleátem 34

5.5 Měření tokových vlastností 36

5.6 Zkoušky emulzního typu 37
5.6.1 Zkouška s barvivem 37
5.6.2 Zkouška vodivosti 37
5.7 Hodnocení proliferace a viability buněk *in vitro* 37
5.8 Disoluce gentamicinu a vankomycinu 38
6 Diskuze a výsledky 39
6.1 Volba vnější olejové fáze 41
6.2 Zkoušky emulzního typu 43
6.3 Tokové chování emulzí 44
6.3.1 Vliv způsobu homogenizace na tokové chování emulzí 44
6.3.2 Vliv antibiotik na tokové vlastnosti 47
6.3.3 Vliv NaCl na viskozitu emulze 49
6.3.4 Volba emulgátoru 50
6.4 Prolifrace a viabilita mezenchymálních kmenových buněk 55
6.5 Liberace antibiotik z kostních štěpů impregnovaných emulzí 57
7 Závěry 59
8 Seznam obrázků 60
9 Seznam použité literatury 61

Abstrakt

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Farmaceutické technologie
Řešitelka práce: Štěpánka Vedralová
Název diplomové práce: Formulace a charakterizace emulzí typu v/o pro lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí
Školitelka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem diplomové práce bylo připravit depotní lékovou formu pro prevenci a lokální léčbu muskuloskeletálních infekcí. Formulována byla emulze typu v/o, která díky rozdělovacímu koeficientu mezi vnější a vnitřní fází může poskytnout prolongované uvolňování léčiva. Ve funkci olejové fáze byly testovány oleje s odlišnou viskozitou. Pro přípravu emulzí byl vybrán trikaprin, z důvodu nejvyšší stability připravené emulze. Jako emulgátory byly použity lecitin a sorbitan monooleát nebo polyglyceryl-3-polyricinooleát (PGPR) a magnesium stearát. Vodnou fází byl roztok vankomycin-hydrochloridu a gentamicin-sulfátu. Byly hodnoceny tokové vlastnosti na rotačním reometru. Byl sledován vliv složení emulze a způsobu homogenizace na koeficient konzistence a index tokového chování emulzí. Emulze s lecitinem mají vyšší viskozitu a strukturu citlivější na změnu složení (např. přídavek NaCl) nebo způsob homogenizace v porovnání s emulzemi stabilizovanými PGPR. Byla testována disoluce antibiotik z morselizovaných kostních štěpů impregnovaných emulzí. Došlo ke snížení burst efektu a prodloužení doby disoluce na 6 dní v porovnání s roztokem antibiotik. Emulze mírně snižují viabilitu a proliferaci mezenchymálních kmenových buněk, ale díky osteoinduktivitě štěpů nebyla snížena pod hraničních 80 %.

Klíčová slova: muskuloskeletální infekce; emulze typu v/o; antibiotika; tokové chování; uvolňování léčiv

Abstract

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Author: Štěpánka Vedralová

Title of diploma thesis:

Formulation and characterization of w/o emulsions for local treatment of musculoskeletal infections

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The aim of the diploma thesis was to formulate a depot dosage form for the prevention and local treatment of musculoskeletal infections. A water-in-oil emulsions have been formulated which, due to the partition coefficient between the outer and inner phases, can provide sustained drug release. Oils with different viscosities were tested as oil phases. Tricaprin was chosen for the preparation of emulsions, due to the highest stability of the prepared emulsion. Lecithin and sorbitan monooleate or polyglyceryl-3-polyricinooleate (PGPR) and magnesium stearate were used as emulsifiers. The aqueous phase was a solution of vancomycin hydrochloride and gentamicin sulphate. The flow properties on a rotational rheometer were evaluated. The influence of the emulsion composition and the homogenization method on the coefficient of consistency and the index of flow behaviour of the emulsions was studied. The emulsions stabilized with lecithin have a higher viscosity and a structure more sensitive to changes in composition (e.g., NaCl addition) or homogenization method compared to PGPR stabilized emulsions. The dissolution of antibiotics from emulsion-impregnated bone grafts was tested. The burst effect was reduced, and the dissolution time was extended to 6 days compared to the antibiotic solution. The emulsions slightly reduced the viability and proliferation of mesenchymal stem cells, but due to the osteoinductivity of the grafts, it was not reduced below the limit of 80%.

Key words: musculoskeletal infections; w/o emulsion; antibiotics; flow behaviour; drug release

1 Zadání práce

Cílem diplomové práce je formulovat emulze typu v/o jako depotní systémy k lokální aplikaci antimikrobních léčiv pro léčbu muskuloskeletální infekce.
Struktura emulzí bude hodnocena na základě stanovení tokového chování emulzí. Dále bude sledován vliv homogenizace a typu emulgátoru na reologické vlastnosti emulze. Testování bude provedeno na rotačním reometru Kinexus Pro+ Malvern Instruments. Bude testována toxicita emulzí a studována disoluce vankomycin-hydrochloridu a gentamicin-sulfátu.

Cíle práce lze konkretizovat

1. Výběr vnější olejové fáze a emulgátoru.
2. Ověření emulzního typu.
3. Měření tokových vlastností a viskozitních křivek. Hodnocení tokového chování emulzí pomocí vhodného reologického modelu.
4. Porovnání viskozity připravených emulzí a výběr optimálního finálního složení. *Ex vivo* disoluční test.
5. Test proliferace a viability mezenchymálních kmenových buněk.
6. Zhodnocení disolučního profilu vankomycin-hydrochloridu a gentamicin-sulfátu a porovnání s výsledky liberace léčiv z roztoku.

2 Úvod

Muskuloskeletální infekce jsou častou komplikací chirurgických zákroku při totální endoprotéze, ale i v rámci zákroku ve spojitosti s poúrazovými stavy. Vzhledem k prodlužujícímu se věku dožití v populaci, je problematika kloubních náhrad čím dál více aktuální. Cílem současné vědy v tomto oboru je najít způsob, jak vzniku infekce předcházet. Možností je v této oblasti více, například úpravy kloubních hlavic nebo výplně kloubní dutiny materiálem, který bude vázat antimikrobně působící látku. Aby byla infekce potlačena, je nutné zabránit adhezi bakterií na kloubní náhradu a dále udržet hladinu antimikrobní látky dostatečnou k potlačení bakteriálního růstu. V případě antimikrobních látek se jako ideální ukázala lokální aplikace. Je tak zajištěna dostatečně vysoká hladina účinné látky v místě potenciálního vzniku infekce a zároveň je snížená celková zátěž na organismus plynoucí z perorálního podání. Účinnost terapie je vyšší, pokud se podaří dostatečnou hladinu antibiotika v daném místě udržet několik dnů, v ideálním případě týdnů.

Tato diplomová práce je zaměřena na impregnaci kostních štěpů antibiotikem. Navazuje tak na experiment zaměřený na liberaci antibiotik z kostních štěpů impregnovaných roztokem gentamicin-sulfátu a vankomycin-hydrochloridu. Naším cílem bylo najít lékovou formu, která by uvolňování léčiva oproti uvolnění z roztoku zpomalila a přiblížit se tak lékovým formám s prodlouženým uvolňováním. Byly sledovány reologické vlastnosti připravených vzorků v závislosti na jejich složení a postupu přípravy. Následně byla sledována liberace antibiotik v daných časových intervalech.

3 Seznam zkratek

PGPR	polyglyceryl-3-polyricinooleát
PVA	polyvinylalkohol
PCL	polykaprolakton
CPP	polyfosfát vápenatý
BBS	bioabsorbovatelná kostní náhrada
PMMA	polymethylmethakrylát
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MBEC	minimální koncentrace k potlačení biofilmu
MCT	triglyceridy se středními uhlíkatými řetězci
LCT	triglyceridy se dlouhými uhlíkatými řetězci
MSC	mezenchymální kmenové buňky

4 Teoretická část

4.1 Prevence a léčba muskuloskeletálních infekcí

Výskyt muskuloskeletální infekce je jedním z největších rizik chirurgických zákroků spojených s kloubní výměnou nebo zákroků při otevřených zlomeninách.[5] Ve větším riziku jsou pacienti s dalšími komorbiditami (např. diabetes mellitus) nebo pacienti, kteří operaci postupují opakovaně (revizní operace). Diagnostika i léčba takovýchto infekcí není snadná a vzniklá infekce je velmi často důvodem k odstranění kloubní náhrady.[1] S ohledem na prodlužující se průměrnou dobu dožití lze očekávat, že zejména zákroků vedoucích k totální endoprotéze bude přibývat. Úměrně s počtem pacientů se pak bude zvyšovat i počet případů, kdy došlo k výskytu infekce v návaznosti na provedený zákrok. Pozornost je věnována zejména prevenci, tedy snaze vzniku infekce předcházet.[4]

Tradiční přístup k řešení infekce zahrnuje podávání intravenózních antibiotik po dobu 6 týdnů, a následně dlouhodobé podávání perorálních systémových antibiotik, většinou spojené s vyjmutím endoprotézy.[1] Záchrana endoprotézy vyžaduje citlivost mikroorganismů, odolnost náhrady a mírný klinický průběh infekce.[2] Postupem času se ukazuje čím dál víc benefitů plynoucích z lokální aplikace antibiotik. Díky lokální aplikaci je možné dosáhnout výrazně vyšších koncentrací antibiotik v místě infekce, čímž je umožněna eradikace i více odolných kmenů bakterií. Dalším benefitem je menší celková zátěž, kterou antibiotika působí na organismus. Navíc vlivem difuze je možné řešit infekci i v avaskulárních oblastech, což by v případě systémové léčby nebylo možné.[3] V současné době se lokální terapie podává zároveň s intravenózní a perorální terapií. Snahou do budoucna je lokální aplikace s dosažením takové účinnosti, aby mohla plně nahradit systémovou léčbu.[19]

Forma lokálně podávaných antibiotik byla představena jako způsob profylaxe vzniku infekce, nicméně záhy se začala zkoumat i jako způsob terapie již rozvinuté infekce.[3] Výskyt infekce se pohybuje okolo 1-2 %, užití antimikrobně impregnovaného cementu snížilo výskyt o více než polovinu.[1]

Zamezit adhezi mikroorganismů se v prevenci infekce ukázalo jako klíčové.[5] Řada kmenů, jež osidlují prostory kloubů, produkují tzv. biofilm. Jedná se o obranný mechanismus bakterií. Vytváří prostředí, ve kterém jsou mikroorganismy méně citlivé

na působení antibiotik a jejich účinnost se tím snižuje. Biofilm je velmi odolný a jeho narušení je obtížné. Kromě lokálního podání antibiotik byla testována i technologická úprava endoprotézy. Jedná se o nanotechnologicky upravený povrch, který by zamezoval přichycení mikroorganismů a tvorbu odolného biofilmu na jeho povrchu. V návaznosti na to se pak objevily implantáty impregnované antibiotiky.[4] Výběr konkrétního antibiotika je vzhledem k rozvoji rezistence značně proměnlivý.[19] S rozvojem biomateriálů koncem minulého století, stoupl zájem o biokompatibilní implantáty.[5] Za ideální nosič léčivé látky bychom označili biodegradabilní látku, která zajistí postupné uvolňování vázaného léčiva, a navíc bude působit osteoindukcně.[3]

4.1.1 Kostní cement

Za technologický standard je považován cement impregnovaný antibiotiky. Používá se k fixaci implantátu nebo výplni prázdné dutiny po odejmutí implantátu. Uvolnění antibiotika z cementu závisí na jeho porozitě, homogenitě a viskozitě, dále poměru povrchu k objemu, a samozřejmě na celkovém množství navázaného ATB. Porozita zvyšuje množství uvolněného antibiotika a prodlužuje dobu eluce. Na druhou stranu nesmí dojít k zvýšení porozity až na tolik, že by byla ohrožena pevnost materiálu a musí být zároveň zaručena homogenita cementu, aby eluce antibiotik probíhala rovnoměrně.[6] Kostní cement má avaskulární charakter, který představuje z hlediska tvorby bakteriálního biofilmu a rozvoji infekce zvýšené riziko. Dalším negativem je nedostatečně prodloužené uvolňování léčiva, nutnost opakovaného zákroku a omezené spektrum antibiotik s ohledem na tepelné zpracování při přípravě.[7]

Existují formy cementu, tvořené sloučeninami kalcium-fosfátu. Nejčastější z těchto sloučenin je hydroxyapatit (HA). HA může být použit jako zásobní matrice, ale lze ho využít i pro potažení implantátu. Vzájemně se liší zpracováním nebo porozitou, ale všechny tyto formy jsou biokompatibilní a působí osteoindukčně. To jsou hlavní výhody, kterých je u kalcium-fosfátového cementu využíváno. Mezi nevýhody naopak patří špatná mechanická odolnost a schopnost resorpce, která se liší podle konkrétního složení cementu.[8]

V současné době nejpoužívanější látkou, která tvoří cement je polymethylmethakrylát (PMMA).[9] Sám o sobě má rovněž řadu nevýhod. Mezi ty hlavní patří malá vazebná kapacita. Navázané léčivo se uvolňuje ihned v počátku, čímž dojde po určité době ke

snížení koncentrace antibiotika pod minimální inhibiční koncentraci (MIC) a zvyšuje se tak riziko rozvoje rezistence. Navíc až 90 % navázaného léčiva zůstane navázáno ve struktuře PMMA matrixu a je potencionálně příčinou rozvoje rezistence. Hlavním negativem PMMA je nebiodegradovatelnost. Znamená to nutnost opakovaného chirurgického zákroku, při němž bude nosič vyjmut, což sebou nese rizika spojená s dalším zákrokem.[10] PMMA je využíván k dalším technologickým obměnám. Jednou u nich bylo navázání silikonu do struktury matrixu PMMA. Vznikla tak difúzní síť, která sice částečně zlepšila pozvolné uvolňování vázaného léčiva, ale měla negativní dopad na mechanickou odolnost, která je zejména u nosných kloubů klíčová. Další obměnou bylo vytvoření cementu PMMA s využitím kalcium-polyfosfátového gelu.[9] Polyfosfát vápenatý (CPP) je složen z lineárních polyfosfátových řetězců, čímž se liší od jiných minerálů fosforečnanu vápenatého, jako je hydroxyapatit (HA). Změnou uskupení došlo k zásadním změnám vlastností. Tato formulace se ukázala velmi efektivní zejména v postupném uvolňování navázaného léčiva. Důvodem je iontová vazba léčiva na polyfosfát.[9] Navíc v tomto případě zůstala zachována mechanická odolnost cementu. CPP má vzhledem k dobrým vlastnostem jak v pevném, tak i kapalném skupenství široké spektrum aplikačních způsobů. Jedná se o látku biokompatibilní, s širokým potencionálem v dalším využití.[11] V současné době výzkum cílí na objevování látek s podobnými vlastnosti jako PMMA, které se ale v těle rozloží a nebudou vyžadovat vyjmutí.[6]

4.1.2 Úprava implantátu

Sám implantát je většinou tvořen kombinací titanu, kobaltu a chromu. Důvodem je jejich pevnost a odolnost proti korozi.[12] Je ale výhodné povrch implantátu modifikovat tak, aby byl kompatibilní s okolní tkání, a navíc působil osteoindukčně.[5]
Výsledný produkt můžeme dle mechanismu působení dělit na „pasivní" a „aktivní". Pasivně bude působit implantát, který díky upravenému povrchu brání adhezi mikroorganismu. Jako aktivní pak označujeme formy s účinnou látkou, která se z implantátu uvolní a tím brání dalšímu rozvoji infekce. Jednou variantou navázání účinné látky je nanést léčivo napovrch implantátu pomocí máčení či nástřiku a následného sušení. Druhou možností je vytvořit zásobník léčivé látky, která se uvolňuje pomocí difuze nebo destrukcí matrixu.[5]
Z hlediska mechanismu působení účinných látek je lze rozdělit na dvě skupiny. Látky, které působí osteoindukčně a látky, které budou působit antiinfekčně, a tím předcházet přilnutí bakterií na povrch implantátu a rozvoji infekce. V praxi jsou využívány kombinace těchto složek tak, aby byly pokryty obě požadované funkce. Osvědčila se například kombinace HA a polymer. Polymer funguje jako nosič antibiotika a dodává pevnost soustavě HA. HA zajišťuje osteoindukční funkci, kterou polymery většinou postrádají. Obdobně může fungovat kombinace polymeru s kolagenem[13] nebo růstovými faktory.[3]

Příklady látek, které podporují obnovu kostní tkáně:

- Calcium fosfáty tvoří přirozenou složku kosti, v praxi se nejčastěji setkáme s HA. Zásadní je struktura povrchu, pórovitost znamená větší osteoindukční efekt.
- Povrch titanových implantátu bez úprav je běžně hydrofobní. V praxi se jako výhodnější ukázalo přidat na povrch hydrofilní OH skupiny, které zvyšují osteokonduktivitu.
- Z řady biologických peptidů - Kolagen typu I.
- Růstové faktory jsou přirozeně produkovány během osteogeneze. Pokud jsou implementovány jako biologický obal, tento proces dále podpoří.

Příklady látek s antiinfekčním působením:

- Antibiotika (sama o sobě ale potřebují nosič, na který je lze jako účinné látky navázat – např. polymery, calcium fosfát nebo titanové nanotrubičky).
- Stříbro (Ag) má přirozenou antiinfekční aktivitu, narušuje bakteriální membránu a váže se na DNA bakterie, čímž působí stříbrem potažený implantát antimikrobně.
- NO se v těle mění na peroxynitril, který oxidačními procesy poškozuje bakteriální membránu.
- Oxidy titanu se po aktivaci UV záření mění na peroxid a hydroxylové skupiny, které rovněž působí oxidativní poškození membrány.[13,5]

Příkladem biodegradovatelných polymerů, které se využívají jako nosiče účinných látek jsou polyvinylalkohol (PVA), polykaprolakton (PCL)[14], kopolymer PLGA, polymléčná kyselina (PLA), poly(DL-lactic acid) (PDLLA) a polyethylenglykol (PEG). Polymery ve formě nanočástic tvoří obalovou vrstvu na implantátech, umožňují prodloužené uvolňování, a to až po dobu 8 týdnů. Výhodou prodlouženého uvolňování je kromě dlouhodobě stálé hladiny antibiotika i snížení vysoké počáteční koncentrace, která by zvyšovala toxicitu léčiva. Můžeme se setkat i s přírodními polymery. Jedná se například o houbovitý kolagen nebo produkty krevního srážení (fibrinová síť). Jejich využití v praxi ale není zdaleka tak běžné.[3]

4.1.3 Kostní štěpy

Forma kostních štěpů jako nosičů léčiv patří mezi poměrně nové metody. Častěji jsou štěpy používány pro výplň tzv. mrtvého prostoru. Tento prostor vzniká při léčbě osteomyelitidy během opakovaného chirurgického zákroku. V první fázi je do prázdného místa vložen cement, napuštěný antibiotiky. Ten ale musí být po určité době vyjmut. Prostor je poté vyplněn kostními štěpy, jejichž hlavní výhodou je biodegradovatelnost.[3] Kostní štěpy ale mohou být použity nejen jako další krok po vyjmutí cementu, ale i samostatně. Jednostupňové zákroky jsou spojeny s nižším rizikem infekce, kratší dobou hospitalizace a v neposlední řadě nižšími náklady na léčbu.[15] Kostní štěpy stimulují osteoindukci, osteokondukci a osteogenezi. Další z jejich pozitivních vlastností jsou biokompatibilita a biodegradovatelnost.[16] Kostní štěpy představují obdobně jako kostní cement avaskulární výplň, a tedy určité riziko z hlediska adheze mikroorganismů a rozvoje infekce. Dnes jsou považované za přínosný doplněk systémové terapie.[7]

Prvním krokem je získání kostních štěpů. Způsob odebrání kostního štěpu může být autologní, tedy odebrané přímo z tkáně pacienta anebo allogenní, kdy se dárce a příjemce liší.[16,17] Následně se kostní štěpy mísí s antibiotikem. Antibiotika mohou být aplikována ve formě prášku, kdy jsou míseny s morselizovanými (namletými) kostními štěpy nebo pomocí máčení štěpů v roztoku antibiotik. Jejich uvolňování se poté řídí kinetikou 1. řádu.[3] V praxi prozatím patří mezi nejvíce osvědčená antibiotika kombinace vankomycinu s tobramycinem. Používá se koncentrace přibližně 1 g vankomycinu a 1,2 g tobramycinu na 25 g kostních štěpů.[3] Koncentrace léčiv, kterými jsou štěpy impregnovány je limitní z hlediska viability MSC. Při nadměrné koncentraci by mohlo dojít k poškození štěpů nebo okolní tkáně a následně ke ztrátě osteoindukčních vlastnosti.[67]

Uvolnění léčiv impregnovaných na kostní štěpy závisí mimo jiné na konkrétním typu antibiotika a podmínkách impregnace. Společným znakem je uvolnění velké části celkového objemu antibiotika během prvních 24 hodin. Snížení tohoto iniciálního množství je důležité nejen z hlediska uvolňování v určitém časovém horizontu, ale také vzhledem k toxicitě, kterou může vyšší nárazová dávka antibiotika způsobit.[6]

V léčbě osteomyelitidy byla v rámci randomizované studie využita tzv. bioabsorbovatelná kostní náhrada (BBS). Jednalo se o alfahemihydrát síranu

vápenatého impregnovaný tobramycinem.[9] Calcium-sulfát se osvědčil jako nosič léčivé látky, a navíc působí osteoindukčně, proto lze s jeho pomocí účinně potlačit infekci a zároveň stimulovat růst kosti.[16] Prášek calcium-fosfátu se smíchá s antibiotiky, vytvoří se pasta, která se plní do formy a výsledkem jsou sférické útvary o průměru 7 mm, kterými se naplní kloubní dutina.[18] Účinnost shodná s PMMA se ukázala u 86 % sledovaných pacientů.[19] Na rozdíl od PMMA se ale do 8 týdnů kompletně samovolně rozloží, čímž pacientovi uleví od rizik spojených s vyjmutím nosiče.[4]

4.2 Emulze

4.2.1 Definice

Emulze jsou tekuté disperzní soustavy tvořené nespojitou vnitřní fází, která je rozptýlená ve vnější spojité fázi. Kapaliny, které disperzi tvoří, jsou vzájemné nemísitelné nebo jsou mísitelné pouze velmi omezeně.[20,21]

Emulze lze rozdělit na několik základních typů. Prvním typem jsou emulze typu o/v (olej ve vodě). Vnější fázi těchto emulzí tvoří hydrofilní složka, proto jsou oproti druhé skupině polárnější. Právě rozdílné polarity se využívá při důkazových zkouškách pro odlišení typu emulze. Druhým typem jsou emulze typu v/o (voda v oleji). U těchto emulzí je vnější spojitá fáze tvořena lipofilní složkou.[22] Třetím typem by pak byly tzv. dvojité (násobné) emulze, jejichž složení je v/o/v nebo o/v/o.[20]

Emulze lze aplikovat například topicky, transdermálně, perorálně nebo parenterálně. Je možné využít emulze jako nosiče léčiv inkorporovaných ve vnitřní fázi. Díky tomu je možné aplikovat intravenózně hydrofobní léčivo jako součást emulze o/v, prodloužit uvolňování hydrofilního léčiva z emulze typu v/o nebo například maskovat nežádoucí chuť léčiva.[23,24]

4.2.2 Příprava emulzí

Konkrétní postup přípravy se liší podle zvolené metody (anglická, kontinentální s fázovou inverzí, *in situ* tvorba emulgátoru).[25] Pro spojení dvou nemísitelných kapalin je nutná přítomnost emulgující látky a dostatečná energie. Emulgátor snižuje napětí mezi fázemi, energie je předána prostřednictvím homogenizátoru, čímž dojde ke snížení a sjednocení velikosti částic.[28] Je důležité, aby byla jedna fáze k druhé přidávána pomalu po částech za stálého míchání.[31]

Mísení vnitřní fáze s vnější je označováno jako emulgace. Během tohoto procesu dochází za přítomnosti emulgátorů k vzájemnému pronikání obou fází. Emulgátory jsou látky typické svou amfifilní povahou, díky čemuž se hromadí na rozhraní mezí hydrofilní a lipofilní fází, kde vytváří stabilizační vrstvu okolo molekul vnitřní fáze.[26] Emulgace je proces dynamický, spojený s náhlými změnami napětí na rozhraní fází, i proto je důležité, aby vazba emulgátoru proběhla co nejrychleji. Emulgátor se váže na nově vznikající fázové rozhraní a snižuje mezifázové napětí.[31] Rychlost vazby

emulgátoru je podstatná i z hlediska stability nově vznikajících částic emulze, které mají tendenci koaleskovat.[27]

Následně je třeba emulzi homogenizovat. Homogenizace je proces, při kterém dojde ke sjednocení velikosti částic vnitřní fáze, čímž se emulze stabilizuje. Stupeň homogenizace lze ovlivnit zvoleným typem homogenizátoru. Stupněm rotace nebo tlaku lze velmi přesně ovlivňovat velikost vznikajících částic. Cílem je dosáhnout vzniku monodisperzního systému, který se vyznačuje vysokou stabilitou.[28]

Typy homogenizace:

- VYSOKOTLAKÝ HOMOGENIZÁTOR

Objemové čerpadlo tlačí primární emulzi za pomoci vysokého tlaku přes ventil homogenizátoru, při čemž dojde k rozbití větších částic, a tedy k homogenizaci vzorku.

- ROTOR-STATOR MIXER (vysokorychlostní)

Vysokorychlostní homogenizátor se skládá z jedné či více řad rotorových listů, které nasedají na hřídel oběžného kola. To je obklopeno perforovanou statickou částí. Tento typ je často využíván v případě, kdy je kontinuální fáze zkoušeného vzorku příliš viskózní na to, aby mohla být efektivně pumpována soustavou vysokotlakého homogenizátoru.[28]

- VORTEX MIXER

Mechanismus spočívá v kombinaci oscilace a excentrické rotace, čímž dochází k mísení kapalin uvnitř zkumavky. Metoda je vhodná pro menší množství vzorku, proto je využívána zejména v prostředí laboratoře.[29]

- ULTRAZVUKOVÁ HOMOGENIZACE

Mechanismus kapilárních vln, které přirozeně vznikají na fázovém rozhraní, vede ke vzniku částic. Tyto částice jsou ale příliš velké na to, aby vznikla stabilní emulze. Proto je tento jev nežádoucí. Dostatečně malé částice vznikají vlivem oscilace a následného rozrušení zvukem o dostatečné frekvenci. Dále se uplatňuje proces kavitace (tvorba dutin v kapalině při poklesu tlaku). Zejména princip procesu kavitace není zcela pochopen.[30]

Běžně se v praxi setkáme s dvoustupňovou homogenizací. K vytvoření primárního produktu je využito homogenizátoru typu rotor-stator a následně vysokotlakého homogenizátoru k úpravě produktu a dosažení vyššího stupně monodisperzity. Mícháním či mechanickou desintegrací získáme částice o velikosti větší než 1μm, které vytvoří emulzi velmi omezené stability. Při použití vysokotlaké homogenizace je možné dosáhnout velikosti částic okolo 250 nm s vysokým stupněm monodisperzity systému.[37] Velikost částic je významných faktorem stability emulze. Pokud jsou částice příliš velké, nepůsobí mezi nimi dostatečně silná tepelná energie, která je příčinou náhodného pohybu částic. Tyto náhodné srážky částic jsou označovány jako tzv. Brownův pohyb. Tepelná síla působí na molekuly vnější fáze a brání jejich usazování. Tím je zvyšována stabilita emulze.[31]

4.2.3 Stabilita emulzí a stabilizace

Stabilita emulze vyjadřuje schopnost dané soustavy odolávat změnám fyzikálně-chemických vlastností v průběhu časového horizontu.[32] Emulze jsou soustavy termodynamicky nestálé. Příčinou jejich nestability je vysoké mezifázové napětí, které se vytvoří na rozhraní hydrofilní a lipofilní fáze.[43] Během vzniku emulze se právě na mezifázové rozhraní váže povrchově aktivní látka, která sníží napětí mezi fázemi a tím emulzi stabilizuje.

Stabilitu emulze dále ovlivňuje mnoho faktorů. Patří mezi ně zvolený emulgátor a jeho množství, viskozita vnější fáze, poměr kontinuální a dispergované fáze, typ homogenizace, ale i doba, po kterou homogenizace probíhá. Další z faktorů jsou podmínky skladování, například časový interval od přípravy emulze nebo teplota, při které je emulze skladována.[43]

Příčiny nestability emulze vychází z několika mechanismů. Může se jednat o reakci stimulovanou gravitační silou, velikostí částic, ale i napětím při vzniku emulze. Jednotlivé typy nestabilit emulzí jsou provázané. Důvodem je potenciace rizika vzniku další nestability, současně se vznikem nestability jiného typu. Například při flokulaci nedochází primárně ke změně velikosti částic, ale jejím vlivem vzniká více kompaktních částic, které jsou náchylné ke koalescenci nebo krémovatění. Přehled všech typů názorně viz Obrázek 1.

Přehled nestabilit vedoucích k rozpadu emulze:

- KRÉMOVATĚNÍ a SEDIMENTACE

Jedná se o gravitační pohyb zapříčiněný rozdílnou hustotou částic vodné a olejové fáze, při kterém vznikají aglomeráty částic. V případě emulzí v/o, pokud má vnitřní fáze větší hustotu, částice tvoří shluky a klesají ke dnu. Jev je definován jako sedimentace. V případě emulzí o/v dochází k opačnému jevu, krémovatění. Vnitřní fáze má menší hustotu než kontinuální, stoupá nahoru a aglomerát se tvoří u hladiny.[32]

- OSTWALDOVO ZRÁNÍ

Je způsobeno rozdílnou velikostí částic v emulzi. Různě velké molekuly jsou ovlivňovány různou silou kapilárního tlaku. Na menší molekuly působí silnější tlak, čímž dochází k difuzi vody z malých částic. Ty se rozpadají a následně dochází ke vzniku nových větších částic.[45]

- FLOKULACE

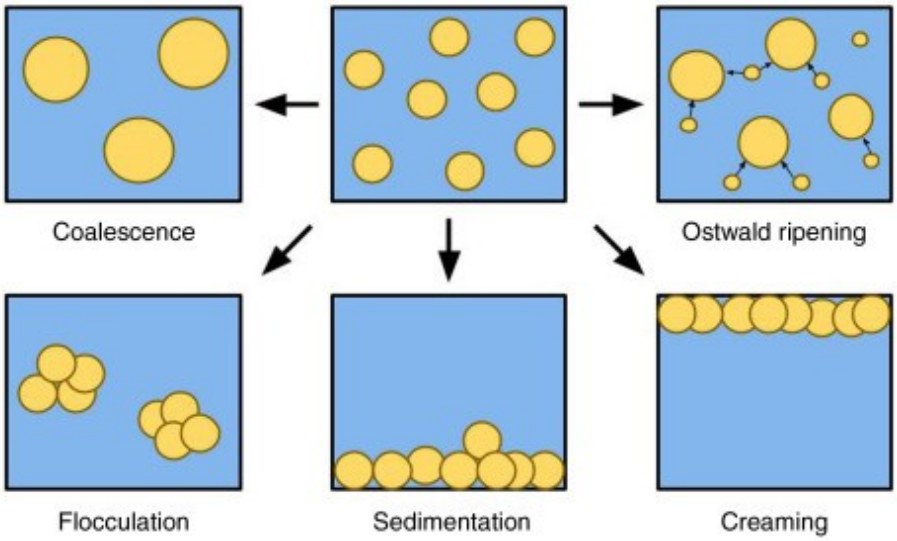
V emulzi dochází k agregaci jednotlivých částic. K reakci dochází vlivem vzájemné adsorpce povrchů částic, při kterém ale nedochází k porušení fázového rozhraní a následnému zmenšení plochy povrchu. Malé částice zůstávají zachovány, ztrácí pouze kinetickou identitu.[31,33]

- KOALESCENCE

Stejně jako v případě flokulace dochází k interakci povrchů částic, které jsou ve vzájemné blízkosti. V případě koalescence ale původní částice zajikají a vzniká nová částice s větším objemem, menším povrchem a nižší povrchovou energií.[31]

- FÁZOVÁ INVERZE

Jev, při kterém se vnitřní dispergovaná fáze změní ve vnější kontinuální. Je vždy doprovázen změnou uspořádání povrchově aktivních látek na fázovém rozhraní. Může být vyvolán například změnou teploty, přídavkem soli nebo změnou v objemovém poměru obou fází. Jedná se o jev, který dramaticky změní vlastnosti emulze. Může se ale jednat o jev žádoucí, a proto záměrně vyvolaný.[34]



Obrázek 1: Příklady nestability emulzí[35]

Výsledkem těchto jevů je oddělení fází. Může k tomu dojít v průběhu minut, ale i měsíců. Doba se odvíjí od vlastností konkrétní emulze uvedených výše.[36]

Pro stabilitu emulzí je důležité inhibovat procesy, které by vedly k jejímu rozpadu. Jedním z hlavních kritérii je velikost částic vodné fáze. Menší částice mají menší potenciál k sedimentaci a shlukování.[37] Velkou roli hraje v případě stability i volba emulgátorů, případně jejich kombinace. Výběr emulgátoru se řídí Bancroftovým pravidlem a hodnotou HLB. Emulgátor vytvoří okolo částic vodné fáze ochrannou vrstvu a zároveň zvýší viskozitu kontinuální fáze. Pokud bychom zvolili emulgátor s mezní HLB, může být vzniklá emulze náchylná k fázové inverzi.[38]

Na základě Stokesova zákona můžeme odvodit, že stabilita soustavy je vyšší s rostoucí viskozitou. Větší poloměr částic naopak zvyšuje riziko sedimentace.[39]

$$v = \frac{2ga^2(\rho_1 - \rho_{2)}}{9\eta} \qquad (1)$$

v stupeň sedimentace

g gravitační konstanta [m/s^2]

a poloměr částic [m]

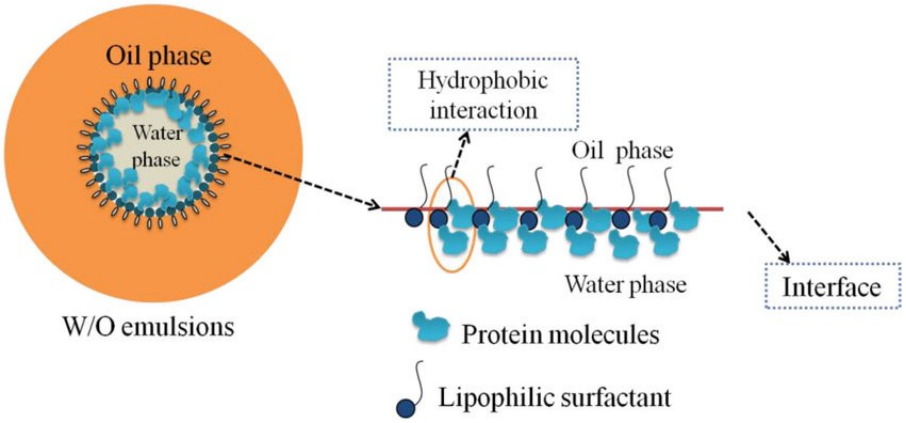
η dynamická viskozita [kg/m.s^{-1}]

ρ hustota částic [kg/m^3]

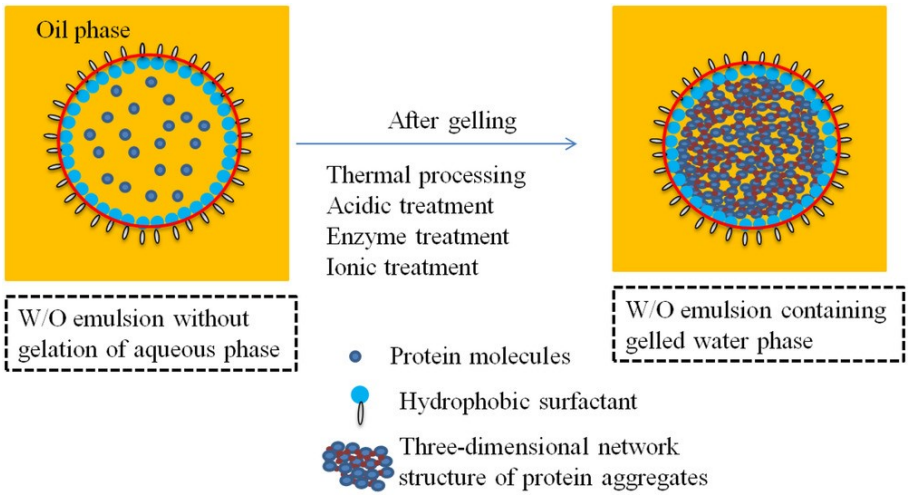
Lze definovat tři základní metody vedoucí ke stabilizaci emulze. Zvýšit viskozitu kontinuální fáze, snížit poloměr částic a minimalizovat rozdíl mezi hustotou vnější a vnitřní fáze.[28] Viskozita vnější fáze závisí na hustotě zvolné olejové fáze, kterou lze zvýšit přídavkem tzv. stabilizátorů.[30] Tyto látky nejsou povrchově aktivní. Nemají tudíž tendenci hromadit se na rozhraní fází, ale reagují s ostatními molekulami pomocí van der Walsových vazeb. Tyto molekuly tvoří v kontinuální fázi prostorovou síť, která brání vzájemným interakcím molekul. Tím se zvyšuje stabilita emulze. Jedná se o různé typy lipidových částic, např. parafíny nebo triglyceridy, případně polymery. Některé stabilizátory mohou působit kombinovaně. Částečně interagovat na fázové rozhraní a zároveň tvořit prostorovou síť.[40] Na podobném principu fungují voskové částice. Mechanismus jejich působení je závislý na teplotě. Při běžné laboratorní teplotě jsou částice navázané na rozhraní, při zvýšení teploty dojde k roztavení částic. Ty se poté stávají součástí kontinuální fáze a stabilizují emulzi zvýšením viskozity kontinuální fáze.[41]

Stabilitu emulze mohou dále ovlivnit látky, které mění vlastnosti vnitřní fáze. První takovou skupinou látek jsou biopolymery.[42] Jedná se například o proteiny, konkrétně β-laktoglobulin, izolovaný syrovátkový protein (WPI), izolovaný sójový protein (SPI) nebo kasein. Jak je patrné na Obr. 2, protein s emulgátorem interaguje na mezifázi hydrofobní interakcí. Přítomnost proteinu má vliv na distribuci velikosti částic a viskozitu, což ovlivní stabilitu emulze. S tímto účelem lze použít i kombinace proteinů nebo typ gelujících proteinů. Ty vytváří ve vnitřní fázi trojrozměrnou síť (Obr. 3), která se na mezifázi chová jako gel a zvyšuje tak odolnost částic vodné fáze proti mechanickému namáhání. Vlivem toho je snížena pohyblivost těchto částic a snižuje se tím riziko rozpadu emulze. Proteiny mohou začít gelovat vlivem zvýšené teploty nebo přidáním další složky. Takovou látkou jsou například sodné, vápenaté nebo hořečnaté soli (NaCl, CaCl2, MgCl2).

Obdobně jako proteiny, včetně tvorby prostorových sítí, mohou fungovat i polysacharidy, například deriváty celulosy, xanthan, pektin, karagenan nebo modifikované škroby. [43]



Obrázek 2: Interakce proteinu s emulgátorem[43]



Obrázek 3: Gelace vnitřní fáze[43]

V případě emulzí typu v/o se jako efektivní ukázal přídavek inorganických solí, například CaCl2, MgSO4, NaCl nebo MgCl2. Vlivem solí se sníží přitažlivé síly mezi kapkami vodné fáze, čímž se snižuje riziko koalescence a sedimentace. Přidáním soli dále zabraňujeme Ostwaldovu zrání.[44,45] Mechanismus spočívá ve změně celkového tlaku uvnitř soustavy, konkrétně se jedná o tlak Laplaceův (tlak uvnitř a vně při zakřiveném povrhu) a tlak osmotický. Za normálních okolností působí na menší částice vyšší tlak než na větší, což vede k difuzi do velkých částic. Přidáním soli se tyto tlaky více vyrovnají, což ve výsledku zpomalí (zastaví) proces Ostwaldova zrání.[45] Soli jsou součástí vnitřní vodné fáze. Je zde ale riziko interakce soli s emulgátorem, čímž by naopak mohlo dojít ke snížení celkové stability systému.[38] Přítomnost soli má totiž dopad na adsorpci povrchově aktivní látky na fázovém

rozhraní, což může vést k tomu, že nedojde k ustálení rovnováhy mezi fázemi. Vlivem vyšší koncentrace soli, tedy může docházet k flokulaci, což vede ke zvětšování velikosti kapiček emulze.[46] Za hraniční je považována koncentrace NaCl 0,012 M. Pokud je koncentrace nižší, nedochází k potlačení Ostwaldova zrání. Zcela zastaven by tento proces měl být při koncentraci NaCl nad 0,188 M[46], v praxi se používá koncentrace od 0,25 M.[47]

V případě stabilizace emulze pomocí pevných částic je mechanismus jejich působení dvojí. Částečně vychází z vazby na mezifázovém rozhraní. Zbylé částice, které se na rozhraní nenavážou a zůstanou volné, pak tvoří prostorovou síť. Emulze stabilizované pevnými částicemi se vyznačují velkou stabilitou a jsou známé jako tzv. Pickeringovy emulze. Prozatím jsou za standard považovány nebiologické částice. Nejčastěji se pro stabilizaci emulzí v/o používají silikonové částice, případně organický latex. Především v posledních letech je ale snaha o využití materiálu biologického původu. Často se jedná o biopolymery nebo jejich kombinace. Jako příklad můžeme uvést deriváty celulosy, modifikované škroby nebo lignin.[44]

4.3 Emulze typu v/o pro parenterální aplikace

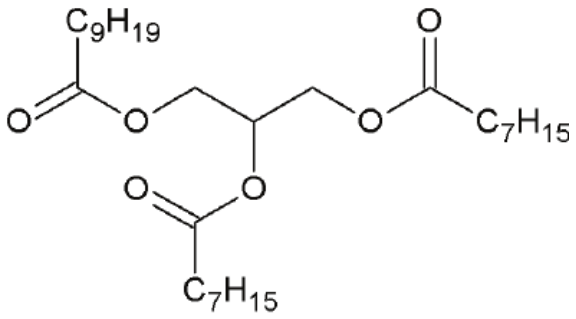
Z hlediska emulzí typu v/o lze parenterální aplikací zamýšlet subkutánní nebo intramuskulární podání, kdy se léčivo postupně uvolňuje z lékové formy a vstřebává se do krevního řečiště. Dále také lokální aplikaci do postiženého místa, kde je systémový účinek naopak nežádoucí a léčivo působí pouze v konkrétním místě. V obou případech jsou emulze využívány pro inkorporaci hydrofilního léčiva a slouží jako nosiče léčivých látek s prodlouženým uvolňováním.[24]

Přestože se v případě emulzí s olejovou vnější fází očekává po podání do organismu postupné uvolňování inkorporovaných léčivých látek, jedná se například v porovnání s polymerním nosičem o poměrně rychlý proces. Prodloužené uvolňování vyplývá z chemických vlastností navázané látky a její vaznost na disperzní medium. V emulzi typu v/o je ve vnitřní fázi inkorporováno hydrofilní léčivo. Jeho afinita je tedy vyšší k vnitřní fázi a přestup do vnější fáze vychází z rozdělovacího koeficientu (poměr koncentrace léčivé látky rozpuštěné v olejové fázi a koncentrace látky rozpuštěné ve vodné fázi). Čím nižší je rozdělovací koeficient, tím je látka lépe rozpustná ve vodě a obtížně přechází do olejové fáze. Pro látky lipofilní (s vysokým rozdělovacím

koeficientem) platí opak. Na uvolnění léčiva má rovněž vliv poměr dispergované a kontinuální fáze, neboť poměr fází ovlivní rozdělovací koeficient, a tudíž dostupnou frakci léčiva.[48,49]

V případě parenterální aplikace jsou nároky na složení emulze výrazně vyšší než v případě transdermální nebo perorální aplikace. Jedním z limitů je volba emulgátoru. Standardem jsou přírodní fosfolipidy, označované jako lecitiny. Může se jednat o žloutkový lecitin anebo mohou být připraveny extrakcí z rostlin (sójový, kukuřičný). Ze skupiny přírodních emulgátorů, lze parenterálně využít také sodnou sůl deoxycholové kyseliny. Dále je možné použít například Poloxamer 188, Tween nebo Span 20.[24] Nejen typ, ale i množství emulgátoru má vliv na stabilitu emulze. Pokud je množství emulgátoru příliš malé, dochází k aglomeraci olejové fáze. Pokud je emulgátoru nadbytek, dochází k rozpadu emulze z důvodu koalescence.[27] V případě lecitinu se množství emulgátoru pohybuje od 0,5 – 4 %. S přibývajícím množstvím emulgátoru (v uvedeném rozmezí) se lineárně zvyšuje množství vodné fáze, kterou je emulgátor schopen navázat. Obvykle se v praxi využívá koncentrace 1–2 %, v závislosti na množství vodné fáze. Výhodou lecitinu je schopnost vázat i emulze blížící se rovnoměrnému poměru fází.[50,51] Při použití PGPR jako emulgátoru byla emulze nejstabilnější s použitím 2,5% koncentrace emulgátoru.[52]

Emulgační schopnosti emulgátoru jsou závislé mimo jiné i na typu olejové fáze. Podle počtu uhlíků mastných kyselin, které tvoří olejovou fázi, se dělí na triglyceridy se středním počtem uhlíků (MCT) a triglyceridy s dlouhými řetězci (LCT). Pro parenterální aplikaci lze z MCT využít např. trikaprin (Obr. 4). Ze skupiny LCT jsou pro parenterální aplikaci využívány hlavně rostlinné oleje, např. olivový, sójový nebo jojobový.[53]



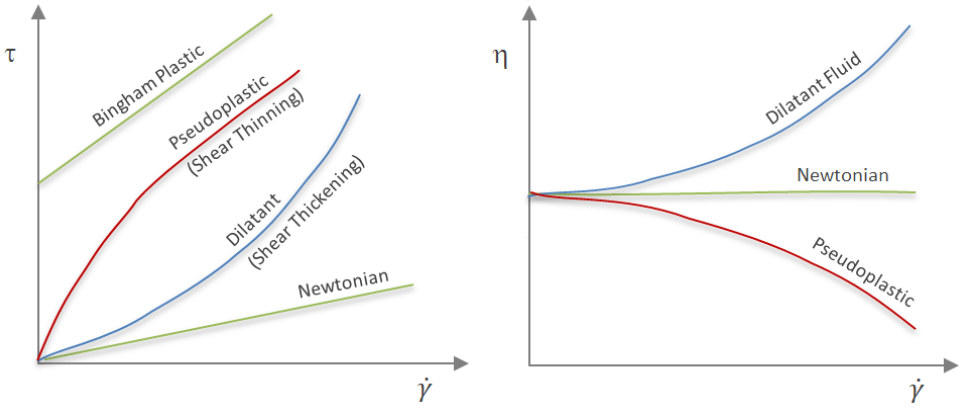
Obrázek 4: Molekula trikaprinu[54]

Stabilita emulze je významně ovlivněna rovněž poměrem fází.[55] Se zvýšením poměrné části vodné fáze lineárně roste viskozita emulze. Za zvýšení viskozity jsou zodpovědné vodíkové vazby, jejichž poměr stoupá s přibývajícím obsahem vodné fáze. Zmenšuje se vzdálenost mezi molekulami a zvyšuje se odolnost částic proti tečení.[56]. Zároveň ale zvýšením podílu vodné fáze dochází ke zvýšení velikosti částic, které mají větší potenciál spolu interagovat. Následkem interakcí dochází k rozrušení povrchové vrstvy, která odděluje jednotlivé částice emulze. Množství vodné fáze, se kterým lze ještě připravit stabilní emulze je závislé na emulgačních schopnostech použitého emulgátoru.[56]

4.4 Analýza tokových vlastností

Pro charakterizaci tokových vlastností nenewtonských soustav jsou využívány tokové a viskozitní křivky, které jsou vyjádřením vztahu posuvného napětí, rychlostního spádu a viskozity. Viskozita je schopnost materiálu odolat tečení. Rychlostní spád vyjadřuje míru namáhání, kterou na soustavu působíme. Jeho rozsah během měření se nastaví na základě toho, jak bude soustava reálně namáhána, což vyplývá ze způsobu aplikace.[57]

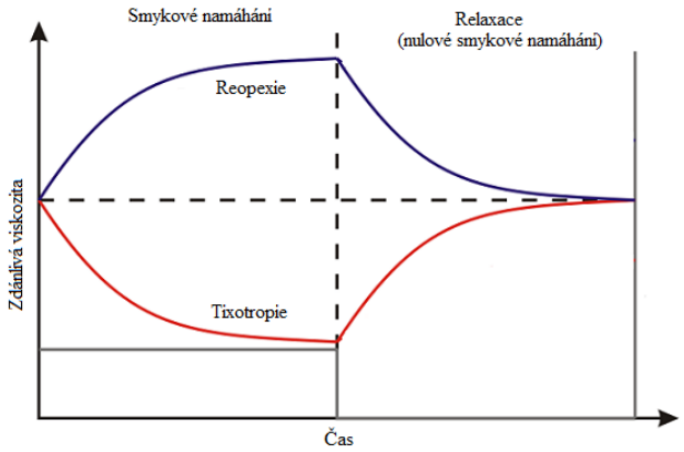
Nenewtonské soustavy dělíme na dvě skupiny. První skupinou jsou časově nezávislé soustavy, které dále dělíme na pseudoplastické, plastické (binghamské) a dilatantní. U pseudoplastických soustav viskozita s rostoucím namáháním klesá, což je případ testovaných emulzí. Plastické soustavy vykazují tzv. mez toku, což znamená, že k tečení dochází až po překročení určitého smykového napětí. Dilatantní soustavy jsou takové soustavy, jejichž viskozita při zvyšujícím se namáhání naopak roste (Obr. 5).[58]



(a) *(b)*

Obrázek 5: Tokové *(a)* a viskozitní *(b)* křivky dle typu soustavy[59]

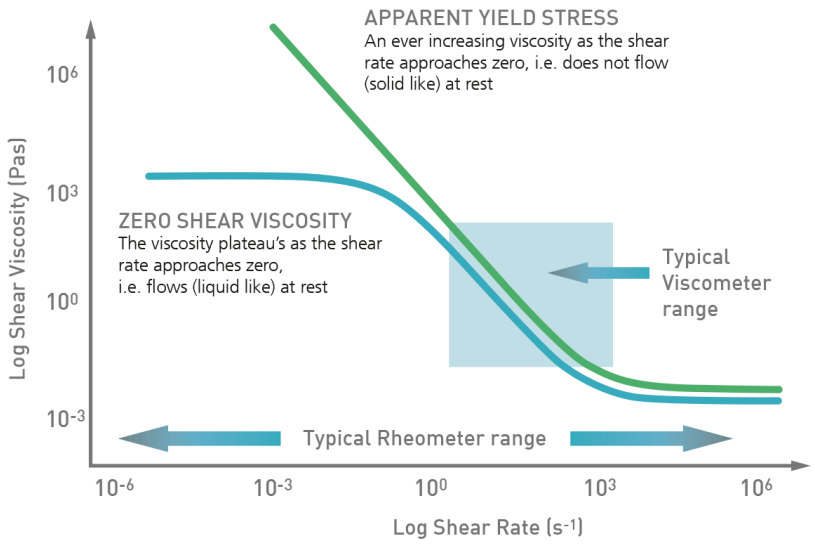
Druhou skupinou jsou soustavy na čase závislé, které dělíme na tixotropní a reopexní. U tixotropních soustav dochází při namáhání k reverzibilnímu izotermnímu přechodu gel-sol-gel, u reopexních soustav je to opačně (Obr. 6).[58]



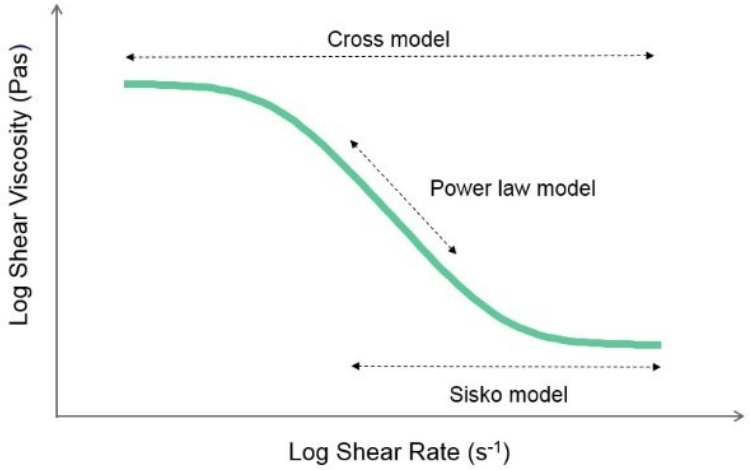
Obrázek 6: Reopexní a tixotropní soustava[60]

Z hlediska reologických vlastností je zásadní průběh křivky v oblasti nízkých hodnot rychlostního spádu. Na základě chování soustavy a výsledné tokové křivky můžeme určit, zda se jedná o soustavu kapalnou nebo pevnou. Pokud je měřená soustava kapalina, při nízkém namáhání je viskozita konstantní a oblast značíme jako tzv. plateau's viscosity, newtonovské plató nebo zero shear viscosity. Pro pevné látky je pak typická mez toku (yield stress). K poklesu viskozity dochází až po překročení

určité hodnoty napětí. Poté viskozita klesá lineárně až do oblasti tzv. infinitní viskozity. Závěrečnou část křivky tvoří právě oblast infinitní viskozity (infinity viscosity). V této oblasti již nedochází k poklesu viskozity (Obr. *7*). Tokové křivky lze vyhodnotit pomocí některého z matematických modelů (Obr. 8).[61]



Obrázek 7: Popis viskozitní křivky[57]



Obrázek 8: Matematické modely pro konkrétní oblasti[62]

Newtonův reologický model popisuje tokové chování kapalin, u kterých lze očekávat konstantní závislost viskozity v průběhu namáhání soustavy. Posuvné napětí je přímo úměrné rychlostním spádu a konstantou úměrnosti je viskozita.

$$\tau = \eta\dot{y} \qquad (2)$$

τ posuvné napětí [Pa]

η dynamická viskozita [Pa·s]

$\dot{y}$ rychlostní spád [s^{-1}][63]

Další z matematických modelů, který lze vyhodnocení použít je Power law model, který popisuje lineární oblast křivky. Jedná se o mocninný model popsaný vztahem:

$$\tau = KD^n \qquad (3)$$

τ posuvné napětí [Pa]

D rychlostní spád [s^{-1}]

K koeficient konzistence [Pa·s^n]

n index tokového chování [bezrozměrné]

Koeficient konzistence vyjadřuje viskozitu soustavy v klidu. Číselně tedy odpovídá viskozitě při rychlostním spádu 1 s^{-1}. Index tokového chování udává míru odlišnosti od newtonovských soustav, u kterých je n = 1. Čím více se číslo liší od jedné, tím je soustava citlivější vůči působení smykového napětí. Pokud jsou hodnoty menší než 1, jedná se o soustavy pseudoplastické. Pokud je hodnota vyšší než 1, soustavu označujeme jako dilatantní.[64]

Oblast infinitní viskozity, kdy již soustava nereaguje na zvyšování rychlostního spádu, popisuje Sisko model. Je dán vztahem: [65]

$$\eta = \eta_{\infty} + K\dot{\gamma}^{n-1} \qquad (4)$$

η zdánlivá viskozita [Pa·s]

η_{∞} infinitní viskozita (*infinite shear viscosity*) [Pa·s]

$\dot{\gamma}$ rychlostní spád [s^{-1}]

K koeficient konzistence [$Pa \cdot s^n$]

n index tokového chování [-]

5 Experimentální část

5.1 Použité suroviny

Alogenní kostní štěpy z hlavice stehenní kosti (Tkáňová banka FN HK)

Gentamicin-sulfát 80 mg/2 ml, Lek, injekční/infuzní roztok

Chlorid sodný, Dr. Kulich Pharm. ČR

Jojobový olej, Sigma Aldrich

Lecitin, Sigma Aldrich

Magnesium-stearát, Dr. Kulich Pharma, ČR

Methylenová modř, Sigma Aldrich

Olivový olej, Sigma Aldrich

Polyglyceryl-3 polyricinoleate (PGPR), Evonic, Essen, Německo

Sorbitan monooleát, Dr. Kulich Pharma, ČR

Sudan III, Sigma Aldrich

Trikaprin, Sigma Aldrich

Vankomycin-hydrochlorid 500 mg, Mylan, prášek pro infuzní roztok

Voda na injekci, Fresenius Kabi, ČR

5.2 Použité přístroje a pomůcky

Absolutní rotační reometr KinexusPro+, Malvern UK

Analogový multimetr METRAmax 2, Gossen Metrawatt TME ČR

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

Automatická pipeta, rozsah 1 ml – 10 ml, Eppendorf research plus, UK

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

Magnetická míchačka s ohřevem, Steinberg, Německo

Mini Vortexer, Heathrow Scientific, UK

Ultrazvukový homogenizátor, Bandelin, Německo

Vodní lázně s integrovanou třepací platformou SW 22 (Julabo)

5.3 Přehled vzorků

Byly připraveny emulze, které se liší složením olejové fáze, emulgátory, koncentrací vnitřní fáze a způsobem homogenizace. Byly měřeny tokové vlastnosti těchto emulzí a ty pak vzájemně porovnávány. Přehled vzorků uvádí Tabulka 1 a Tabulka 2.

Tabulka 1: Emulze s obsahem vnitřní fáze 30 %

Označení emulze	**Olejová fáze**	**Emulgátory**	**Vodná fáze**	**Typ homogenizace**
E1 A	Trikaprin	Lecitin Sorbitan monooleát	Vankomycin Gentamicin	Vortexer 3 x 1′
E2 A		Magnesium-stearát PGPR		
E1 B		Lecitin Sorbitan monooleát	Voda na injekci	Bez homogenizace
E1 C				Vortexer 3 x 1′
E1 D				UZ 10 s (5)
E1 E				UZ 30 s (5)
E2 B		Magnesium stearát PGPR		Vortex 3 x 1′

Tabulka 2: Emulze s obsahem vnitřní fáze 40 %

Označení emulze	**Olejová fáze**	**Emulgátory**	**Vodná fáze**	**Typ homogenizace**
E3 A	Trikaprin	Lecitin Sorbitan monooleát	Vankomycin Gentamicin 0,5M NaCl	UZ 10 s (5)
E4 A		Magnesium-stearát PGPR		
E3 B		Lecitin Sorbitan monooleát	0,5M NaCl	Vortexer 3 x 1′
E3 C				Vortexer 6 x 1′
E3 D				UZ 20 s (5)
E3 E				UZ 10 s (5)
E4 B		Magnesium-stearát PGPR	0,5M NaCl	Vortexer 3 x 1′
E4 C				Vortexer 6 x 1′
E4 D				UZ 20 s (5)
E4 E				UZ 10 s (5)

UZ ultrazvukový homogenizátor (číslo v závorce = stupeň pulzování)

5.4 Postup přípravy emulzí

5.4.1 Emulze stabilizované magnesium-stearátem a polyglyceryl-3 polyricinoleátem

Do vialky o objemu 20 ml bylo odměřeno 6,5 ml trikaprinu ve funkci olejové fáze, do které bylo přidáno 0,05 g magnesium stearátu (Mg-stearát) a 0,2 g polyglyceryl-3 polyricinoleátu (PGPR). Bylo vloženo míchadlo a uvedené složky byly míseny na magnetické míchačce bez zahřívání do úplného rozpuštění. Následně byly po kapkách za stálého míchání přidány 3,0 ml vody na injekci, aby došlo k emulgaci. Emulze byla homogenizována pomocí Mini Vortexeru v intervalech 3 x 1 minuta s minutovým odstupem. V případě emulzí s antibiotiky byla vodná fáze tvořena 1,0 ml vody na injekci, do které byla přidána jedna ampule se 2 ml roztoku gentamincin-sulfátu s obsahem účinné látky 80 mg a následně rozpuštěno 500 mg vankomycin-hydrochloridu. Rozpouštění probíhalo na magnetické míchačce bez zahřívání. Roztok antibiotik byl po kapkách za stálého míchání emulgován do olejové fáze. Následně proběhla homogenizace na Mini Vortexeru. Dále byly připraveny emulze se 40 % vnitřní fáze. Bylo použito 5,5 ml trikaprinu, emulgované 0,05 g Mg-stearátu a 0,2 g PGPR. Vodná fáze byla tvořena 0,5 M NaCl.

5.4.2 Emulze stabilizované lecitinem a sorbitan monooleátem

Do vialky o objemu 20 ml bylo naváženo 6,5 ml trikaprinu ve funkci olejové fáze, do které bylo přidáno 0,1 g sorbitan monooleátu a po částech bylo přidáno 0,35 g lecitinu. Bylo vloženo míchadlo. Vnější olejová fáze s emulgátory byla mísena na magnetické míchačce bez zahřívání do úplného rozpuštění. Po kapkách za stálého míchání byly přidány 3,0 ml vody na injekci. Vzniklá emulze byla následně homogenizována na Mini Vortexeru v intervalech 3 x 1 minuta s minutovým odstupem. V případě vzorku s antibiotiky byla vnitřní fáze připravena a následně smísena s vnější fází analogicky jako v kapitole 5.4.1.

Emulze bez účinné látky byly připraveny ve stejném složení a množství celkem čtyřikrát a byly homogenizovány rozdílnými metodami (E1 B-D. viz. Tab. 1). Jeden vzorek nebyl homogenizován, ponechán pouze po emulgaci na magnetické míchačce. Druhý vzorek byl homogenizován na Mini Vortex mixeru v intervalech 3x1 minuta.

Zbylé dva vzorky byly homogenizovány ultrazvukem po dobu 10, respektive 30 sekund. Dále byly připraveny emulze s 40 % vnitřní fáze. Do vialky s objemem 20,0 ml bylo naváženo 5,5 ml olejové fáze a za stálého míchání přidáno 0,1 g sorbitan monooleátu a 0,35 g lecitinu k emulgaci. Následně byl kapkách přidán 0,5 M roztok NaCl.

V případě všech emulzí s obsahem vnitřní fáze 40 % byla vodná fáze tvořena 0,5 M roztoku NaCl. Byl připraven zásobní roztok v celkovém objemu 50 ml dle výpočtu z molární hmotnosti sloučeniny (M_w = 58,44 g/mol). Na tento objem roztoku připadalo 1,461 g NaCl. Z tohoto zásobního roztoku byly odměřeny 4,0 ml, které se po kapkách přidávaly k olejové fázi. V případě emulzí bez antibiotik, byly použity 4,0 ml připraveného roztoku. V případě emulzí obsahujících antibiotika, byly ke 2,0 ml 0,5 M roztoku NaCl přidány 2,0 ml roztoku gentamicin-sulfátu s obsahem 80 mg účinné látky a 500 mg vankomycin-hydrochloridu. Po rozpuštění antibiotik byla vnitřní fáze za stálého míchání po kapkách přidávána k vnější fázi.
Byly připraveny 2 série emulzí s 40 % vnitřní fáze 0,5 M NaCl bez obsahu antibiotik. Jedna série byla emulgována lecitinem a sorbitan monooleátem (E3), druhá PGPR a Mg-stearátem (E4). Tyto vzorky byly následně homogenizovány různými metodami. Dvě emulze z obou sérií (E3, E4) byly homogenizovány na Mini Vortex mixeru v intervalu 3x1 minuta nebo 6x1 minuta. Další dvě emulze z obou sérií byly homogenizovány pomocí ultrazvuku po dobu 10, respektive 20 sekund. Byla nastavena intenzita UZ 50 % a stupeň pulzování 5 (E3 B-E, E4 B-E, viz Tab. 2, Obr. 9).

Obrázek 9: Emulze emulgované lecitinem a sorbitan monooleátem (vlevo) a PGPR a Mg-stearátem (vpravo)

5.5 Měření tokových vlastností

Bylo měřeno tokové chování olejové fáze emulzí a formulovaných emulzí na rotačním reometru Kinexus Pro+ (Malvern, UK), který je vybaven programem r-Space for Kinexus. Pro olejovou fázi byla použita geometrie kužel-deska CP4/40, pro emulze geometrie CP2/20. Měření probíhalo při teplotě 37 °C a rychlostním spádu v rozsahu 0,1 s^{-1} až 100 s^{-1}. Přehled parametrů testu viz Tab. 3. Vzorek byl standardně nanesen pomocí sekvence *Load sample*. Byl vybrán test *Toolkit_V005 Shear rate ramp – Alternative flow curve.* Po ukončení testu byl vzorek odstraněn dle sekvence *Unload sample*. Tokové křivky byly dle průběhu vyhodnoceny podle Newtonova nebo mocninného (Power law) modelu. Vhodnost modelu byla potvrzena na základě hodnoty koeficientu korelace. V případě newtonského typu toku byly tokové vlastnosti vyhodnoceny pomocí hodnoty viskozity. V případě nenewtonského toku pomocí koeficientu konzistence K ($Pa \cdot s^n$) a indexu tokového chování n (-). Byly měřeny tři vzorky vždy nově nanesené. Byl vypočítán průměr ze tří hodnot a směrodatná odchylka průměru.

Tabulka 3: Parametry testu *Shear Rate Ramp*

Geometrie	CP 2/20 pro emulze CP 4/40 pro olejovou fázi
Sekvence	*Toolkit_V005 Shear Rate Ramp/Alternative Flow curve*
Teplota	37 °C
Rozsah rychlostního spádu	0,1 – 100 s^{-1}

5.6 Zkoušky emulzního typu

5.6.1 Zkouška s barvivem

Na dvě hodinová sklíčka byly naneseny 2 ml emulze. K prvnímu vzorku byly přidány 2 kapky barviva Methylenová modř. K druhému vzorku byly přidány 2 kapky barviva Sudan III. Emulze s barvivem byly promíseny skleněnou tyčinkou. Výsledky byly následně hodnoceny vizuálně. Byla provedena fotodokumentace.

5.6.2 Zkouška vodivosti

Byla provedena zkouška emulzního typu pomocí vodivosti elektrického proudu. Do připravené emulze byly vloženy elektrody připojené na elektrický obvod. Následně byla sledována výchylka na stupnici ampérmetru.

5.7 Hodnocení proliferace a viability buněk *in vitro*

Byl hodnocen vliv impregnace kostních štěpů emulzí s antibiotiky na proliferaci a viabilitu mezenchymálních kmenových buněk *in vitro*. Test a vyhodnocení bylo provedeno v Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Kostní dřeň byla získána od dárce bez komorbidit podstupujícího totální náhradu kyčelního kloubu v důsledku osteoartritidy. Izolované plně charakterizované mezenchymální kmenové buňky byly ošetřeny podle standardních operačních protokolů, jak bylo popsáno dříve (Prochazka et al., 2010).[66] Test proliferace a viability byl proveden s emulzí E1 A (Tab. 1). Jedná se o emulzi stabilizovanou lecitinem a sorbitan monooleátem, kde vnitřní fáze tvoří 30 % emulze.

Konkrétní složení testované emulze je:

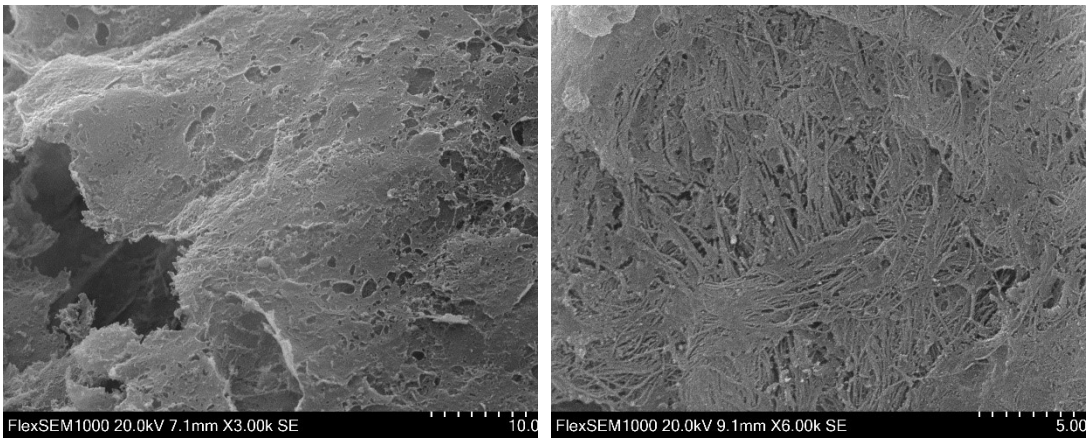
Trikaprin	6, 55
Sorbitan monooleát	0, 10
Lecitin	0, 35
Gentamicin-sulfát injekční/infuzní roztok	80 mg/2 ml
Gentamicin powder	0,120
Vankomycin-hydrochlorid	0,500
Voda na injekci	ad 10,00

5.8 Disoluce gentamicinu a vankomycinu

Disoluce vankomycinu s gentamicinu byla realizována ve spolupráci s ortopedickou klinikou a Ústavem klinické biochemie a diagnostiky FN HK. Byla připravena emulze stejného složení, které bylo testováno na viabilitu mezenchymálních kmenových buněk. Do třech dialyzačních trubiček (MWCO 6,000 – 8,000) bylo naváženo po 1,0 g alogenních kostních štěpů z hlavice stehenní kosti. Byly přidány 2,0 g emulze obsahující 40 mg gentamicin-sulfátu a 100 mg vankomycin-hydrochloridu. Dialyzační trubičky byly umístěny do vialek na třepačku a po dobu 30 min byly kostní štěpy impregnovány emulzí s antibiotiky. Poté bylo do vialek přidáno 10,0 ml fosfátového pufru pH 7,4 zahřátého na 37,0 °C. Následně byly vialky vloženy do vodní lázně s integrovanou třepací platformou, která byla vytemperována na 37 °C. Frekvence třepání byla 50 kmitů/min s horizontálním pohybem po dráze 22 mm. Ve stanovených časových intervalech (24 h) byl pufr odebrán a nahrazen čerstvým. V odebraných vzorcích disolučního média byl analyzován gentamicin a vancomycin. Kvantitativní stanovení antibiotik bylo realizováno v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové fluorescenční polarizační imunoanalýzou v přístroji Integra Analyzátor 400 Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).[67]

6 Diskuze a výsledky

Cílem práce bylo formulovat depotní systém pro lokální aplikaci léčiv určený k léčbě nebo prevenci muskuloskeletálních infekcí, který bude v průběhu operace aplikován přímo do rány. Lokální terapie představuje pro organismus výrazně nižší zátěž než systémové podání. Lokálně lze navíc aplikovat větší množství léčiva, než jaké by toxicita dovolila při systémové aplikaci. Právě s ohledem na vysokou lokální koncentraci je vhodné zajistit prodlouženou liberaci léčiva z lékové formy a tím snížit toxicitu na okolní tkáň. Za tímto účelem byly formulovány emulze typu voda v oleji. Prodlouženou liberaci inkorporovaných léčiv lze očekávat na základě rozdělovacího koeficientu mezi vodnou a olejovou fází. Dalším mechanismem prodlouženého uvolňování je adheze na povrch kostních štěpů, které slouží při operaci jako spacery. Kostní štěpy navíc vykazují vlastní osteoindukční aktivitu, díky čemuž je podpořena proliferace buněk a proces reparace poškozené tkáně je urychlen. Samotná přítomnost kostního štěpu, stejně jako přítomnost PMMA nebo jiného nosiče, představuje riziko z hlediska uchycení patogenu a rozvoje infekce. Pokud je povrch nosiče impregnován adekvátním množstvím antibiotika, je zachována proliferativní schopnost štěpu a zároveň je výrazně sníženo riziko vzniku infekce. SEM snímky pořízené ve spolupráci s Přírodovědeckou fakultou UHK (Obr. 10) ukazují charakteristický povrch štěpů. Jedná se o vysoce členěnou heterogenní strukturu, do které se emulze s antibiotikem na základě adheze inkorporuje.



Obrázek 10: SEM snímky kostních štěpů

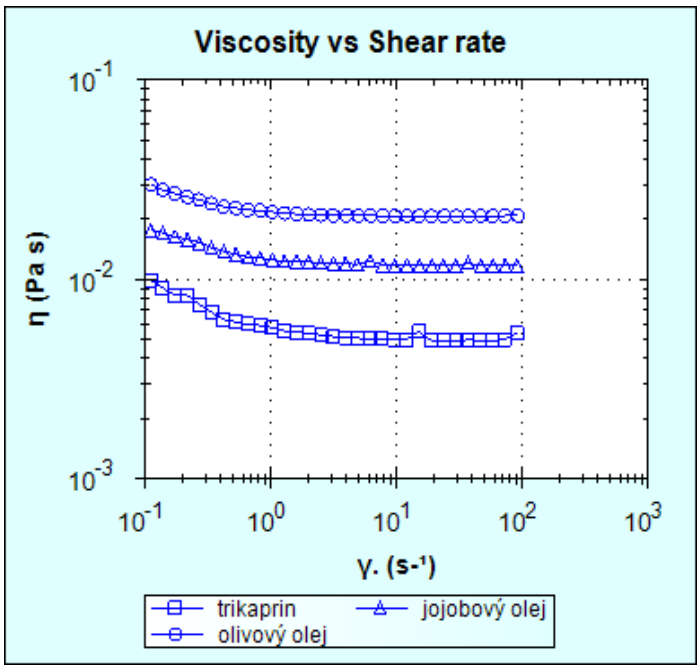
Průběh impregnace a míra adheze jsou ovlivněny tokovými vlastnostmi. Pomocí absolutního rotačního reometru Kinexus Pro+ bylo hodnoceno tokové chování emulzí. Výsledkem měření byly viskozitní křivky zaznamenávající celý průběh působení smykového napětí na změny viskozity emulze. Emulze jsou systémy termodynamicky nestálé, citlivé vůči působení mnoha faktorů, například složení emulze, včetně stabilizačních pomocných látek nebo postup přípravy. Souhrn těchto faktorů ovlivňuje velikost vznikajících částic, distribuci velikosti částic a celkovou stabilitu emulze. Všechny tyto parametry se promítnou ve změně viskozity, jejíž změny v závislosti na rychlostním spádu popisuje průběh viskozitní křivky. Nehomogenní složení hodnoceného vzorku způsobí razantní výkyvy v průběhu měření. Naměřené křivky byly analyzovány dle vhodného matematického modelu, který byl vybrán podle charakteru tokových vlastností (Obr. 8).

Připravená emulze byla použita k impregnaci kostních štěpů. Množství a konkrétní typ antibiotika bylo zvoleno na základě studie doc. Kučery.[67] Kombinaci gentamicinu s vankomycinem zvolili na základě zkušeností z klinické praxe, kdy bylo kombinací právě těchto účinných látek dosaženo eliminace patogenu efektivněji než v případě jednotlivých antibiotik. Množství inkorporovaných antibiotik bylo stanoveno tak, aby odpovídalo jimi zvolené kontrolní skupině komerčně vyráběných nosičů týchž antibiotik. Dalším faktorem, který ovlivnil stanovenou koncentraci antibiotik je viabilita MSC. Pokud by došlo k navázání nadměrného množství antibiotika, jejich funkce by tímto mohla být poškozena. Jev byl sledován na aktivitě alkalické fosfatázy, enzym katalyzující proliferaci kostních štěpů. V případě vankomycinu došlo ke snížení aktivity o 25 % při koncentraci 2000 mg/l. Buňky jsou citlivější na množství gentamicinu, kde došlo k významnému snížení činnosti fosfatázy při koncentraci v rozmezí 10-200 mg/l.[67]

Následně byl proveden *ex vivo* disoluční test. Kostní štěpy byly impregnovány emulzí typu v/o s inkorporovanými antibiotiky. Liberace inkorporovaných léčiv byla hodnocena ze vzorků disolučního media odebíraného v pravidelných intervalech a byla porovnávána s průběhem liberace léčiv z roztoku.

6.1 Volba vnější olejové fáze

Složení emulze včetně procentuálního zastoupení bylo zvoleno na základě literární rešerše.[53] Výběr byl nejvíce limitován způsobem aplikace. Spektrum látek, které lze použít pro parenterální aplikaci a zároveň se s jejich využitím povede připravit stabilní emulzi je omezené. Byly vybrány tři potencionální olejové fáze, které byly vzájemně porovnávány. Měřena byla viskozita trikaprinu, jojobového oleje a olivového oleje. Na Obr. 11 jsou viskozitní křivky vybraných olejů, stanovené při teplotě 37 °C v rozsahu rychlostního spádu 0,1 až 100 s^{-1}. Z jejich průběhu je patrné, že viskozita není konstantní. Při nízkých hodnotách rychlostního spádu je vyšší, vlivem zatížení klesne na hodnotu, která se už dále nesnižuje.



Obrázek 11: Viskozitní křivky olejové fáze

Dle průběhu viskozitních křivek je možno pro jejich matematický popis použít několik reologických modelů, zejména Newtonův nebo mocninný (Power law), popř. Sisko model.[62]

Pro analýzu olejových fází byl zvolen Newtonův a mocninný (Power law) model a vypočteny parametry těchto modelů (Tab. 4-6). Z hodnot koeficientu korelace (corr.) blížících se jedné je patrné, že pro popis jsou vhodné oba modely. Na základě hodnot indexu tokového chování $n > 0,9$ a malého rozdílu v hodnotách koeficientu

konzistence K (mPa·s^n) a dynamické viskozity η (mPa·s) lze konstatovat, že testované oleje jsou newtonské soustavy. Nejvyšší viskozitu při vyhodnocení dle newtonova modelu má olivový olej (23,1 mPa·s), následuje jojobový olej (12,7 mPa·s) a nejnižší viskozita byla zjištěna u trikaprinu (6,4 mPa·s).

Tabulka 4: Analýza tokových křivek trikaprinu

Měření	Power law model			Newton model	
	K (mPa·s^n)	n (-)	Corr.	η (mPa·s)	Corr.
1	9,70	0,9463	0,9997	8,293	1,0000
2	6,31	0,9184	0,9983	5,077	0,9990
3	7,29	0,9152	0,9984	5,761	0,9999
Průměr	7,76	0,9266		6,377	
SD	1,74	0,0171		1,694	

Tabulka 5: Analýza tokových křivek jojobového oleje

Měření	Power law model			Newton model	
	K (mPa·s^n)	n (-)	Corr.	η (mPa·s)	Corr.
1	13,59	0,9492	0,9994	11,80	1,0000
2	16,80	0,9888	1,000	16,23	0,9990
3	11,45	0,9490	0,9994	9,942	0,9999
Průměr	13,95	0,9623		12,657	
SD	2,69	0,0229		3,230	

Tabulka 6: Analýza tokových křivek olivového oleje

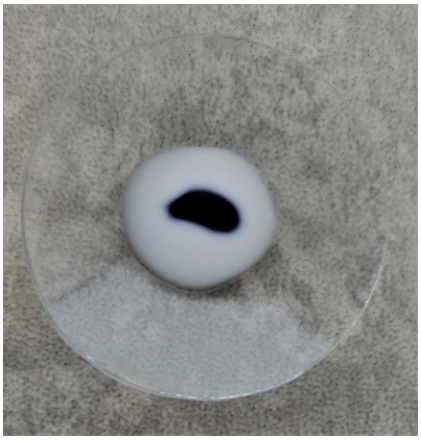
Měření	Power law model			Newton model	
	K (mPa·s^n)	n (-)	Corr.	η (mPa·s)	Corr.
1	23,18	0,9603	0,9995	20,850	1,0000
2	33,05	0,9589	0,9995	29,580	1,0000
3	20,27	0,9720	0,9998	18,770	0,9999
Průměr	25,50	0,9637		23,067	
SD	6,69	0,0072		5,736	

Pro formulaci emulzí typu v/o byl jako olejová fáze vybrán trikaprin. Důvodem byla dobrá stabilita takto připravené emulze. Při použití olejů s vyšší viskozitou lze očekávat vznik viskóznější emulze, který by mohl vést k dalšímu prodloužení liberace inkorporovaných léčiv. V kombinaci se zvoleným emulgátorem (lecitin 3,5 %, sorbitan monooleát) se ale nepovedlo připravit stabilní emulzi. Příčinou může být rozdílná emulgační schopnost emulgátoru pro různé typy olejových fází. Trikarpin patří mezi oleje se středně dlouhými řetězci mastných kyselin (MCT), zatímco jojobový olej a olivový olej je tvořen mastnými kyselinami s dlouhými řetězci (LCT). Byly studovány emulgační účinky lecitinu a PGPR. V případě olejové fáze tvořené MCT (trikarpin) byl jejich emulgační účinek srovnatelný a došlo k vytvoření stabilní emulze. Pro LCT byl však emulgační účinek lecitinu nedostatečný a bylo nutné použít PGPR.[68] V průběhu experimentu byl potvrzen nedostatečný emulgační efekt lecitinu pro emulzi s jojobovým olejem jakožto olejovou fází (LCT), což vedlo k rozpadu emulze. Stabilita s užitím PGPR emulgátoru nebyla potvrzena a vyžaduje další experimentální ověření.

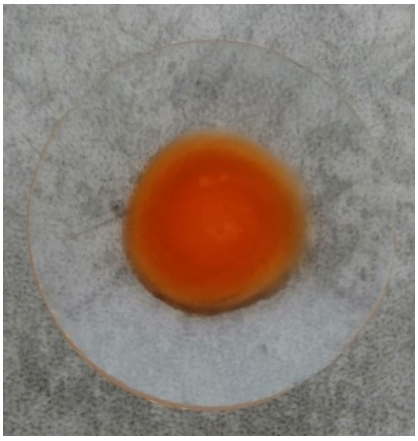
6.2 Zkoušky emulzního typu

Cílem práce bylo formulovat emulze typu v/o, u kterých je vnitřní vodná fáze tvořená roztokem vankomycin-hydrochloridu a gentamicin-sulfátu. Typ emulze byl potvrzen dvěma zkouškami, zkouškou barvivy a zkouškou vodivosti. Zkouška s pomocí barviv byla vyhodnocena pouze vizuálně, lze tedy tuto metodu považovat za méně průkaznou. Zkouška vedení elektrického proudu je hodnocena odečtem ze stupnice ampérmetru a vykazuje tedy menší riziko desinterpretace.

Zkouška barvivy je založena na odlišných vlastnostech barviv hydrofilní a hydrofobní povahy. Hydrofilní zkoumadlo Methylenová modř je nemísitelné s připravenou hydrofobní emulzí (Obr. 12). V případě hydrofobního zkoumadla Sudan III došlo ke smísení barviva s kontinuální hydrofobní fázi, čímž se vizuálně obarvila celá emulze (Obr. 13)



Obrázek 12: Methylenová modř



Obrázek 13: Sudan III

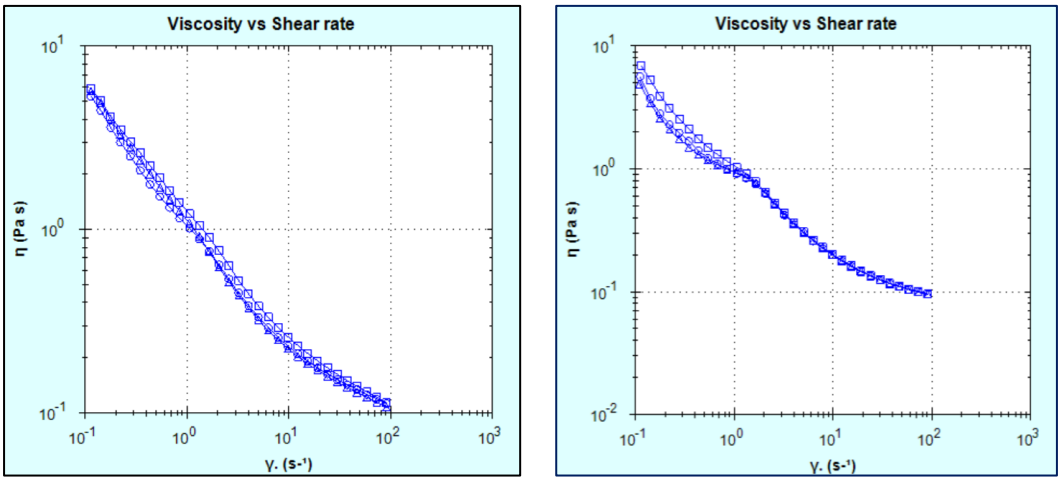
Následně byla provedena zkouška emulzního typu pomocí ampérmetru. Na stupnici ampérmetru nedošlo k výchylce. Jedná se o hydrofobní emulzí, vnější fáze je nepolární a elektrický proud nevede. Emulzní typ byl tedy potvrzen i druhou zkouškou.

6.3 Tokové chování emulzí

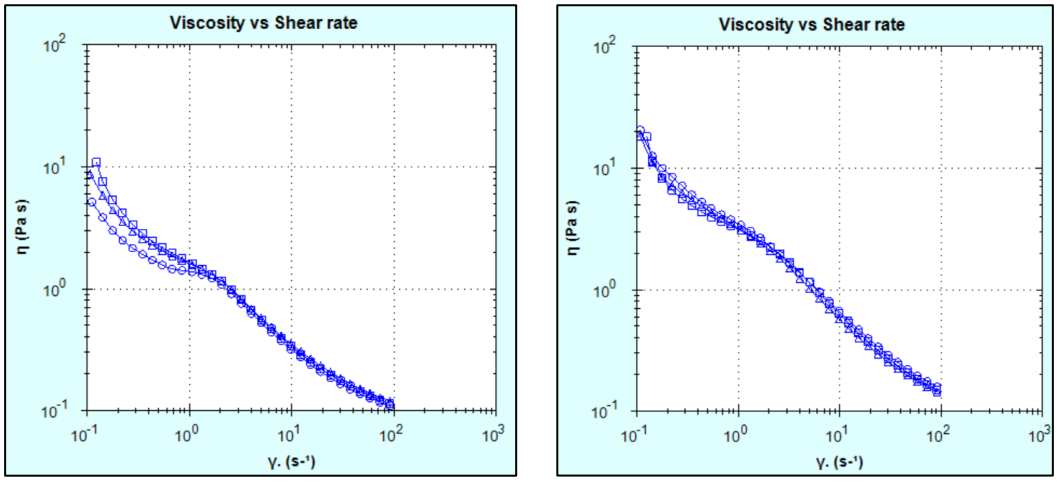
Byly hodnoceny tokové vlastní emulzí. Měřením na absolutním rotačním reometru Kinexus Pro+ byly získány viskozitní křivky, které byly dále porovnávány. Byl sledován vliv homogenizace, obsahu antibiotik, NaCl a vliv emulgátoru.

6.3.1 Vliv způsobu homogenizace na tokové chování emulzí

Byl studován vliv způsobu homogenizace na tokové vlastnosti emulzí (Obr. 14). Homogenizace je proces, při kterém se sníží distribuce velikosti částic a emulze se stabilizuje.[28] Byla hodnocena emulze o složení trikaprin, vodná fáze 30 %, emulgovaná lecitinem (3,5 %) a sorbitan monooleátem. Tokové křivky byly modelovány mocninným modelem. Vhodnost modelu byla potvrzena koeficientem korelace (corr.) > 0,9695. Z prezentovaných výsledků vyplývá, že homogenizace ultrazvukem je účinnější, vede ke vzniku emulze s vyšší viskozitou, která se dále zvyšuje vlivem prodloužení doby homogenizace (Obr. 15). Intenzivnější homogenizací dochází k poklesu velikosti částic vnitřní fáze, což vede ke vzniku viskóznější emulze.[28] Hodnoty koeficientu konzistence a indexu tokového chování jsou uvedeny v Tab. 7.



a) Bez homogenizace *b) Vortex 3 x 1 minuta*



c) UZ 10 sekund *d) UZ 30 sekund*

Obrázek 14: Tokové vlastnosti emulze E1 modelované pomocí Power law modelu

Tabulka 7: Analýza tokových křivek pomocí Power law modelu

Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	1,281	0,3853	0,9817
2	1,148	0,3818	0,9695
3	1,092	0,4092	0,9779
Průměr	1,174	0,3921	
SD	0,097	0,0149	

a) Bez homogenizace

Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	1,098	0,3573	0,9635
2	0,942	0,4064	0,9786
3	0,906	0,4221	0,9827
Průměr	0,982	0,3953	
SD	0,102	0,0338	

b) Vortex 3 x 1 minuta

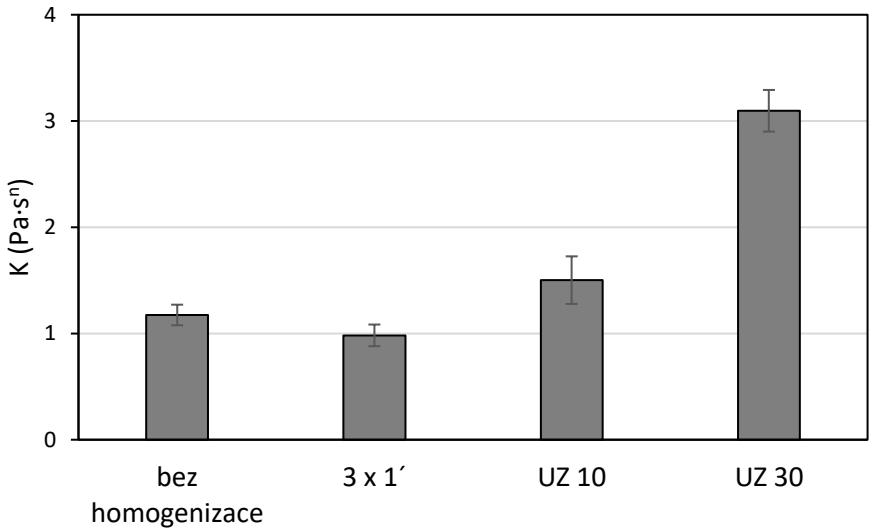
Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	1,684	0,3464	0,9787
2	1,570	0,3876	0,9892
3	1,251	0,4354	0,9885
Průměr	1,502	0,3898	
SD	0,224	0,0445	

c) UZ 10 sekund

Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	2,995	0,3258	0,9749
2	2,971	0,3047	0,9846
3	3,322	0,3063	0,9883
Průměr	3,096	0,3123	
SD	0,196	0,0117	

d) UZ 20 sekund

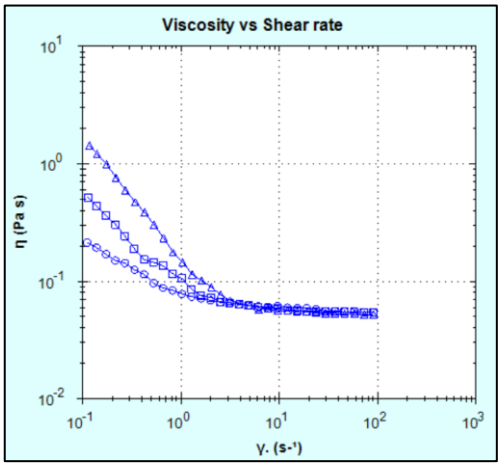
Z Obr. 15 vyplývá, že zvýšením doby homogenizace pomocí UZ se viskozita zvýšila dvojnásobně. Rovněž lze konstatovat, že homogenizace pomocí Vortex mixeru po dobu 3 x 1 minuta neměla na změnu viskozitu emulze žádný zásadní vliv.



Obrázek 15: Vliv způsobu homogenizace na viskozitu emulze s lecitinem a sorbitan monooleátem a 30 % vodné fáze

Dále byla měřena viskozita emulze tvořené trikaprinem ve funkci vnější olejové fáze a 30 % vodné fáze, emulgované PGPR a Mg-stearátem (E2 B). Na Obr. 16 jsou viskozitní křivky této emulze. Křivky byly analyzovány dle Power law modelu (Tab. 8). Z hodnot koeficientu korelace lze soudit, že model je pro danou soustavu vhodný. Hodnoty indexu tokové chování průměrně n = 0,6749 potvrzují nenewtonský typ toku. Tím se liší od emulzí se 40 % vodné fáze 0,5 M NaCl rovněž emulgovaných pomocí PGPR a Mg-stearátu. Roztok NaCl ve vnitřní fázi způsobil celkový pokles

viskozity těchto emulzí, zároveň se ale tokové vlastnosti více přiblížili newtonskému chování a index tokových vlastností těchto emulzí byl n > 0,85 (Tab. 11)



Obrázek 16: Tokové vlastnosti emulze s PGPR, 30 % (E2 B)

Tabulka 8: Analýza tokových vlastností emulze s PGPR, 30 % (E2 B)

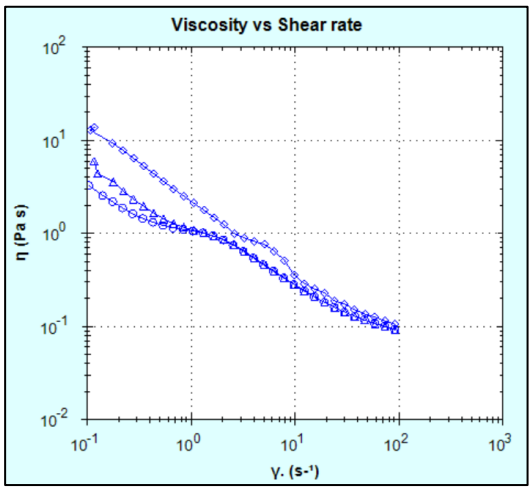
Měření	Power law model		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	0,134	0,6956	0,9752
2	0,225	0,5107	0,9103
3	0,097	0,8184	0,9942
Průměr	0,152	0,6749	
SD	0,066	0,1549	

6.3.2 Vliv antibiotik na tokové vlastnosti

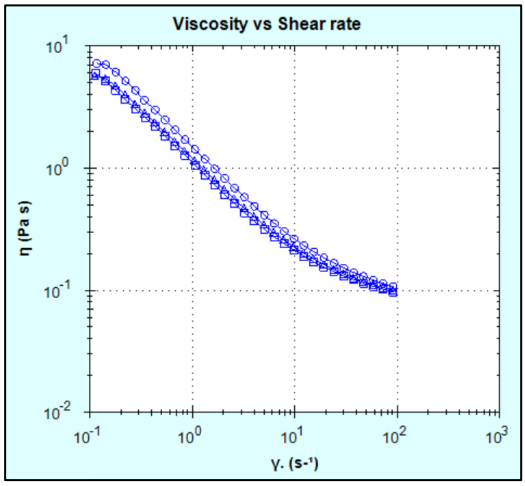
Byly hodnoceny tokové vlastnosti emulzí s antibiotiky. Na Obr. 17 jsou zobrazeny tokové vlastnosti emulze s antibiotikem. Emulze E3 A, emulgovaná lecitinem a sorbitan monooleátem, byla analyzována dle Power law modelu. Emulze E4 A emulgovaná PGPR a Mg-stearátem byla vzhledem k průběhu viskozitních křivek hodnocena rovněž dle Sisko modelu (Tab. 9). Oba zvolené modely byly dle hodnot korelačních koeficientů zvoleny správně.

Vliv přítomnosti antibiotika na viskozitu emulze je uveden na Obr. 18. Emulze s obsahem antibiotik vykazují oproti analogickým emulzím bez antibiotik vyšší

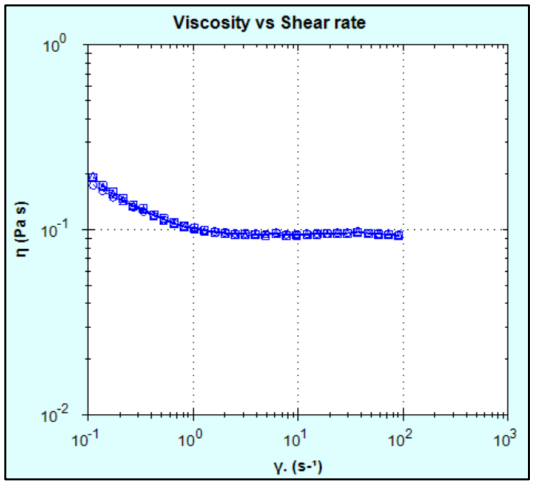
viskozitu a vlivem NaCl dochází k mírnějšímu poklesu viskozity Zvýšení viskozity v přítomnosti antibiotika bude nutno ověřit dalším experimentem a vysvětlit příčinu tohoto jevu.



a) *Lecitin, sorbitan monooleát, 30 % (E1 A)*



b) *Lecitin, sorbitan monooleát, 40 % , NaCl (E3 A)*



c) *PGPR, Mg-stearát, 40 %, NaCl (E4 A)*

Obrázek 17: Tokové křivky emulzí s léčivy (E1 A, E3 A, E4 A)

Tabulka 9: Analýza tokových křivek emulzí s antibiotiky

Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	1,175	0,3997	0,9907
2	0,964	0,4732	0,9913
3	2,327	0,2497	0,9758
Průměr	1,489	0,3742	
SD	0,734	0,1139	

a) Leciitn, sorbitan monooleát, 30 % (E1 A)

Měření	Power law		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	1,166	0,3474	0,9631
2	1,244	0,3437	0,9674
3	1,551	0,3137	0,9644
Průměr	1,320	0,3349	
SD	0,204	0,0185	

b) Lecitin, sorbitan monooleát, 40 % NaCl (E3 A)

Měření	Power law model			Sisko model			
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.	K2 (mPa·s^n)	n (-)	ISV	Corr.
1	0,117	0,9199	0,9978	11,40	0,9977	0,0930	0,9969
2	0,117	0,9236	0,9978	9,41	1,081	0,0938	0,9972
3	0,116	0,9301	0,9986	10,52	0,9482	0,0942	0,9961
Průměr	0,117	0,9245		10,444	1,0090		
SD	0,001	0,0052		0,997	0,0671		

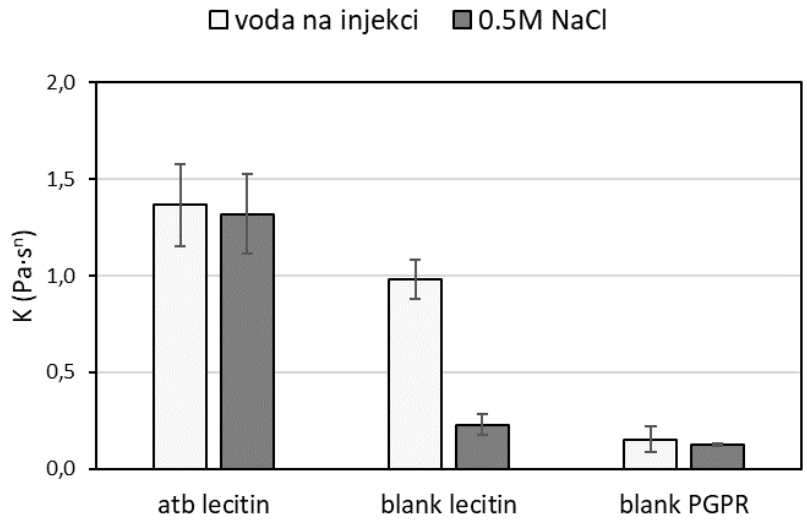
c) PGPR, Mg-stearát, 40 %, NaCl (E4 A)

6.3.3 Vliv NaCl na viskozitu emulze

Byly připraveny emulze s 30 % vodné fáze. Za účelem zvýšení viskozity bylo množství vodné fáze následně navýšeno na 40 %. Takto připravené emulze nebyly dostatečně stabilní, proto byl základě literárních zdrojů zvolen chlorid sodný jako způsob stabilizace emulzí typu v/o. NaCl byl do emulze přidán ve formě 0,5 M roztoku, který tvořil vodnou fázi. Mechanismus stabilizace spočívá ve vyrovnání osmotického tlaku mezi menšími a většími molekulami, čímž zabrání Ostwaldovu zrání. Zároveň se sníží přitažlivé síly mezi kapkami vodné fáze vedoucí k separaci fází.[44]

Z grafu (Obr. 18) je patrné, že přítomnost NaCl ve testované emulzi vede k poklesu viskozity, dle literatury je možný pokles viskozity až o několik řádů.[44] Zajímavý je rozdílný vliv NaCl na viskozitu emulzí stabilizovaných různým typem emulgátorů. Zatímco u emulzí emulgovaných lecitinem je snížení viskozity významné, u emulzí

emulgovaných PGPR k výraznému snížení viskozity nedochází. Příčinou je pravděpodobně odlišné chování emulgátoru na mezifázi. V případě PGPR se mezifázové napětí sníží výrazněji již během emulgace. Při emulgaci lecitinem není naopak počáteční snížení mezifázového napětí tak markantní.[69] Soustava s lecitinem je ale následně více závislá na jakékoli změně ve složení nebo změně při přípravě, kterým může být např. změna typu homogenizace (viz Obr. 21) nebo obsah NaCl (viz Obr. 18). V obou případech je patrné, že emulze s lecitinem reagují na daný faktor výraznější změnou viskozity.



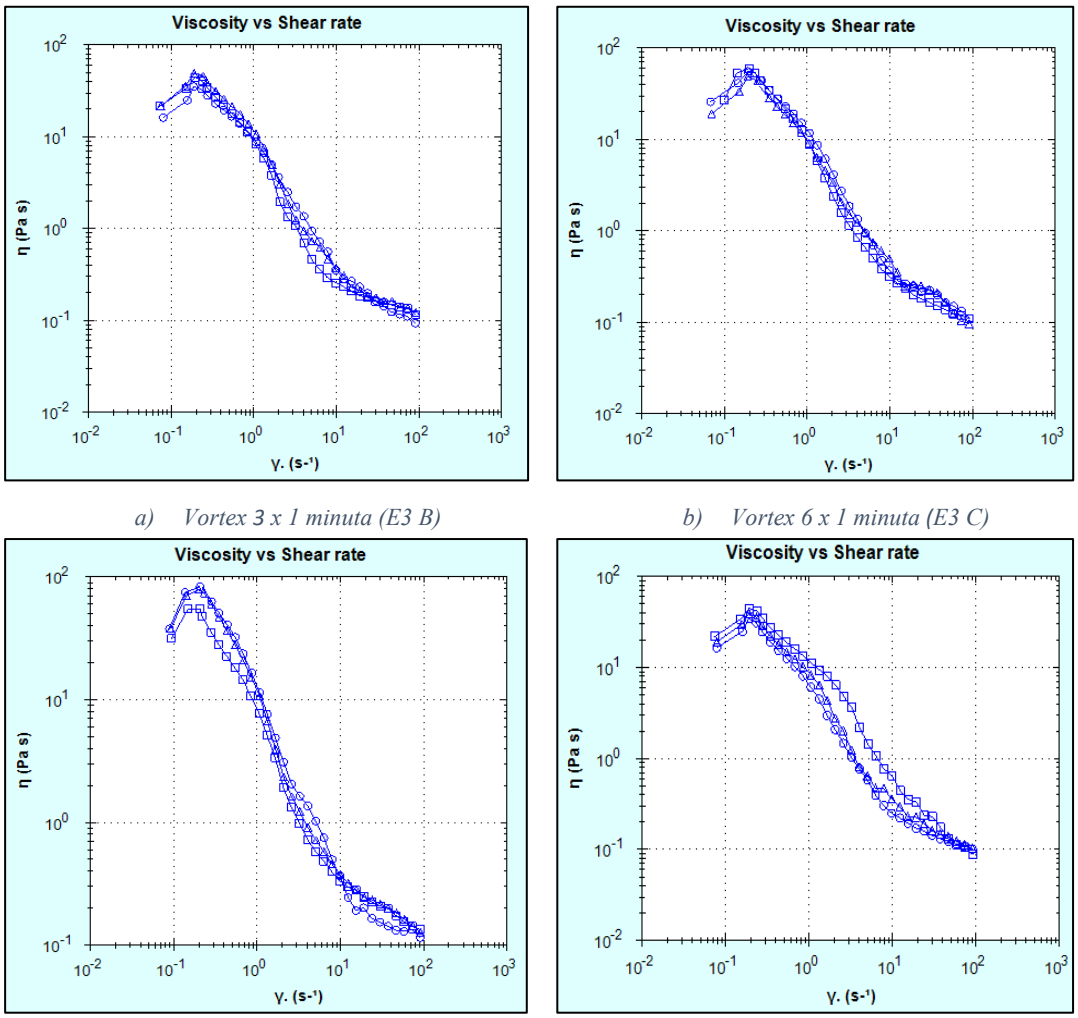
Obrázek 18: Vliv NaCl na viskozitu emulze

6.3.4 Volba emulgátoru

Vliv emulgátoru byl porovnáván u emulzí s 40 % vodné fáze tvořené 0,5 M roztokem NaCl. Emulze řady E3 byly emulgovány lecitinem a sorbitan monooleátem. Emulze řady E4 PGPR a Mg-stearátem (Tab. 2). Koncentrace emulgátorů byly stanoveny na základě literární rešerše.[44,50,51,52] Na 10,0 g emulze bylo použito 0,35 g lecitinu (3,5 %) a 0,1g sorbitan monooleátu (1 %) a 2,0 g PGPR (2 %) a 0,05 g magnesium stearátu (0,5 %).

Na základě tokových vlastností emulzí řady E3 (Obr. 19) lze konstatovat, že se jedná o nenewtonské kapaliny. S rostoucím rychlostním spádem viskozita rychle klesá. Pro analýzu je vhodný Power law model (Tab. 10), který popisuje oblast lineárního poklesu viskozity. Hodnota koeficientu korelace blížící se jedné potvrzuje vhodnost

zvoleného modelu. Koeficient konzistence K odpovídající viskozitě při rychlostním spádu 1 s^{-1} je přibližně K = 9 $Pa.s^{-1}$. Hodnoty indexu tokového chování přibližně n = 0,50 značí poměrně velkou odlišnost od newtonské soustavy.



a) Vortex 3 x 1 minuta (E3 B)

b) Vortex 6 x 1 minuta (E3 C)

c) UZ 20 sekund (E3 D)

d) UZ 10 sekund (E3 E)

Obrázek 19: Tokové křivky emulze s lecitinem, sorbitan monooleát, 30 %, (E3 B-E)

Tabulka 10: Analýza tokových křivek emulze lecitin, sorbitan monooleát, 30 %, (E3 B-E)

Měření	Power law model		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	6,954	0,5960	0,9491
2	8,885	0,4990	0,9079
3	9,819	0,4365	0,9932
Průměr	8,553	0,5105	
SD	1,461	0,0804	

a) Vortex 3 x 1 minuta (E3 B)

Měření	Power law model		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	12.870	0,5982	0,9944
2	8,692	0,3871	0,9309
3	7,848	0,5592	0,9504
Průměr	9,803	0,5148	
SD	2.689	0,1123	

b) Vortex 6 x 1 minuta (E3 C)

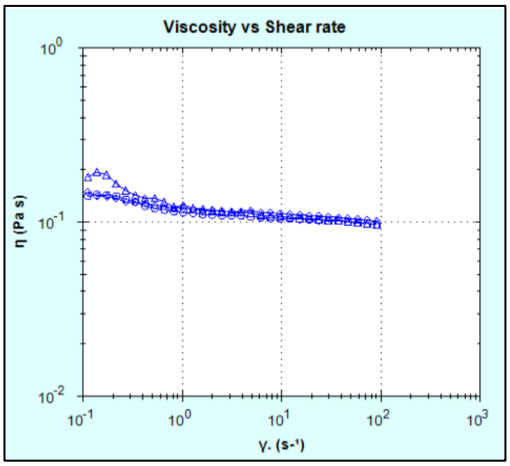
Měření	Power law model		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	7,838	0,7184	0,9731
2	10,890	0,8722	0,9656
3	11,980	0,7904	0,9912
Průměr	10,236	0,7937	
SD	2,147	0,0770	

c) UZ 20 sekund (E3 D)

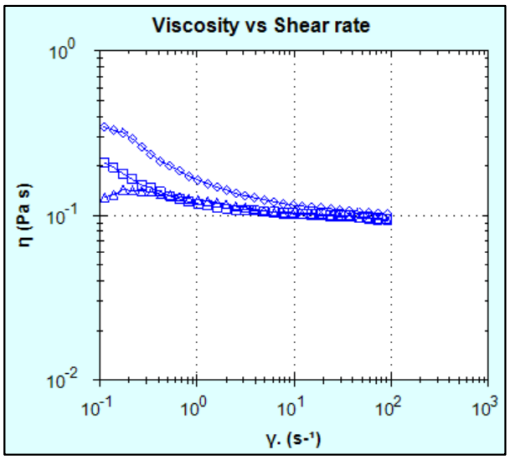
Měření	Power law model		
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.
1	7,170	0,4623	0,9375
2	7,736	0,4941	0,9182
3	5,983	0,4558	0,9847
Průměr	6,963	0,4707	
SD	0,895	0,0205	

d) UZ 10 sekund (E3 E)

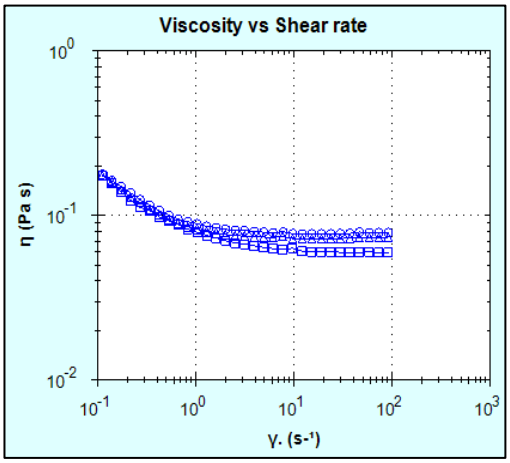
Tokové křivky emulze E4 připravené s použitím PGPR a Mg-stearát ve funkci emulgátoru (Obr. 20) byly analyzovány dle Power lax modelu a podle Sisko modelu. Sisko model byl zvolen na základě průběhu viskozitní křivky, ze které je patrné, že snížení viskozity s rostoucím rychlostním spádem není tak výrazné jako u emulzí emulgovaných lecitinem a sorbitan monooleátem. Podle hodnot koeficientu korelace jsou oba modely pro soustavy tohoto složení vhodné (Tab. 11). V analýze dle Power law modelu se zaměříme na hodnoty koeficientu konzistence přibližně K = 0,12 Pa.s^{-1}. V porovnání s emulzemi řady E3 emulgovanými lecitin a sorbitan monooleátem je jejich viskozita výrazně nižší. Hodnoty n > 0,85 ukazují, že se jedná o soustavu relativně blízkou newtonské soustavě. Sisko model popisuje oblast tzv. infinitní viskozity, kdy s dalším namáháním soustavy nedochází k poklesu viskozity.



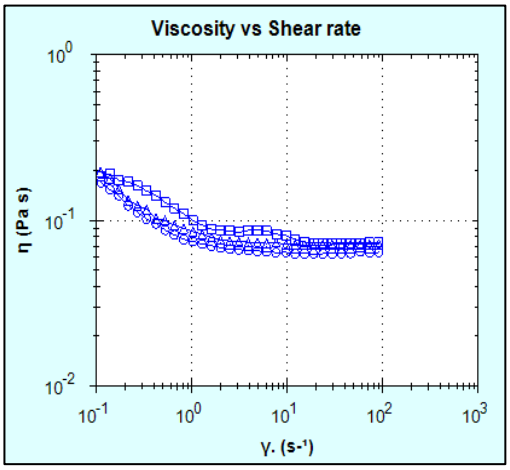
a) Vortex 3 x 1 minuta (E4 B)



b) Vortex 6 x 1 minuta (E4 C)



c) UZ 20 sekund (E4 D)



d) UZ 10 sekund (E4 E)

Obrázek 20: Průběh tokových křivek emulzí obsahujících PGPR, Mg-stearát, 40 %, NaCl (E4 B-D)

Tabulka 11: Analýza tokových křivek emulze E4 B-D (PGPR, Mg-stearát, 40 % vodné fáze, NaCl)

Měření	Power law model			Sisko model			
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.	K2 (Pa·s^n)	n (-)	ISV	Corr.
1	0,135	0,9011	0,9992	0,026	0,5992	0,0994	0,9846
2	0,120	0,9452	0,9998	0,020	0,4343	0,0968	0,9847
3	0,124	0,9533	0,9999	0,020	0,3692	0,1041	0,9882
Průměr	0,126	0,9332		0,022	0,4655		
SD	0,007	0,0281		0,003	0,1212		

a) Vortex 3 x 1 minuta (E4 B)

Měření	Power law model			Sisko model			
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.	K2 (Pa·s^n)	n (-)	ISV	Corr.
1	0,132	0,9039	0,9986	0,021	0,7696	0,0983	0,9984
2	0,123	0,9236	0,9998	0,096	0,0751	0,0110	0,9654
3	0,188	0,8207	0,9970	0,073	0,5876	0,0963	0,9966
Průměr	0,148	0,8857		0,063	0,4774		
SD	0,035	0,0581		0,038	0,3601		

b) Vortex 6 x 1 minuta (E4 C)

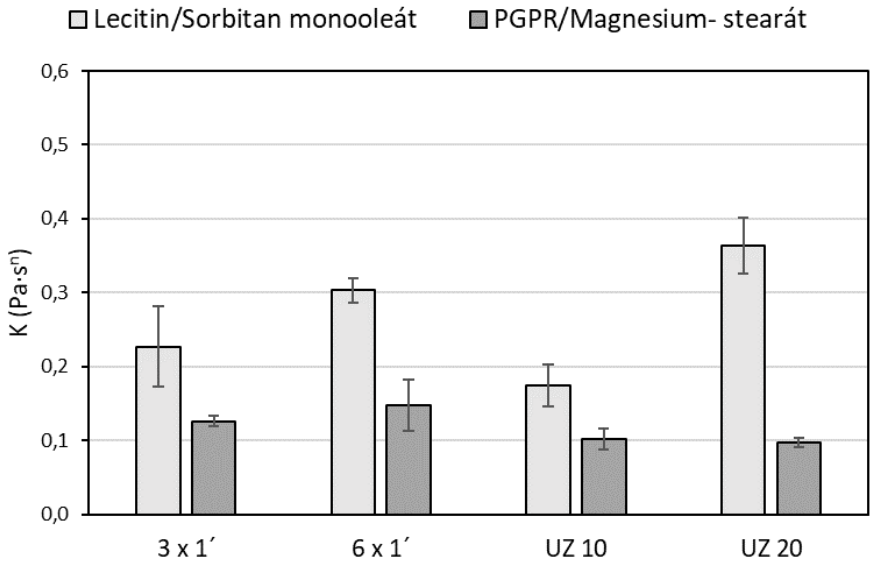
Měření	Power law model			Sisko model			
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.	K2 (Pa·s^n)	n (-)	ISV	Corr.
1	0,090	0,8610	0,9968	0,020	0,8055	0,0588	0,9994
2	0,097	0,8960	0,9968	0,013	0,9674	0,0715	0,9985
3	0,103	0,9004	0,9973	0,014	0,9203	0,0765	0,9981
Průměr	0,097	0,8858		0,016	0,8977		
SD	0,006	0,021		0,004	0,0833		

c) UZ 20 sekund (E4 D)

Měření	Power law model			Sisko model			
	K (Pa·s^n)	n (-)	Corr.	K2 (Pa·s^n)	n (-)	ISV	Corr.
1	0,117	0,8520	0,9975	0,043	0,5260	0,0659	0,9966
2	0,100	0,8789	0,9961	0,015	0,9799	0,0705	0,9984
3	0,089	0,8790	0,9961	0,014	0,9375	0,0622	0,9986
Průměr	0,102	0,8700		0,024	0,8145		
SD	0,014	0,0156		0,016	0,2507		

e) UZ 10 sekund (E4 E)

Z Obr. 21 je patrné, že emulze emulgované lecitinem a sorbitan monooleátem se vyznačují vyšší viskozitou než analogicky připravené a analogicky homogenizované emulze emulgované PGPR a Mg-stearátem. Emulze s lecitinem a sorbitan monooleátem svoji viskozitu významně mění s typem homogenizace, zatímco struktura emulze emulgované PGPR a Mg-stearátem není k namáhání příliš citlivá, jak již bylo vysvětleno výše.

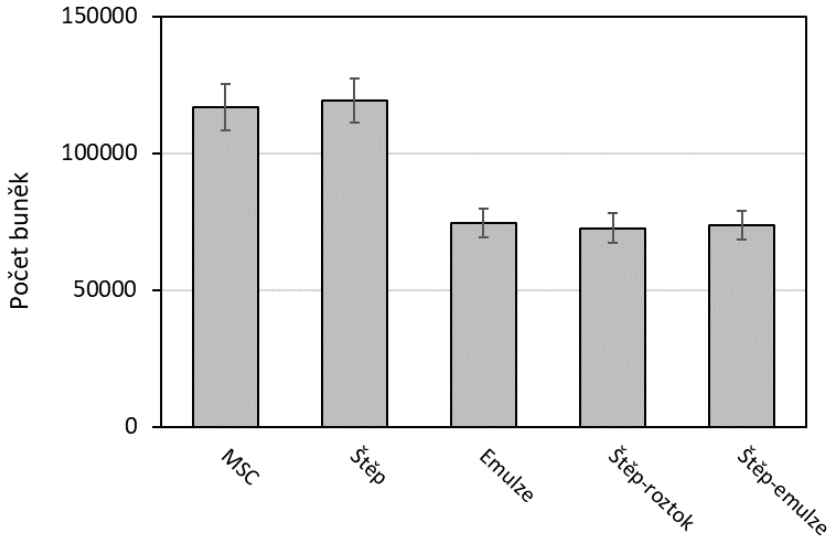


Obrázek 21: Závislost typu homogenizace na viskozitě emulzí s ohledem na typ použitého emulgátoru

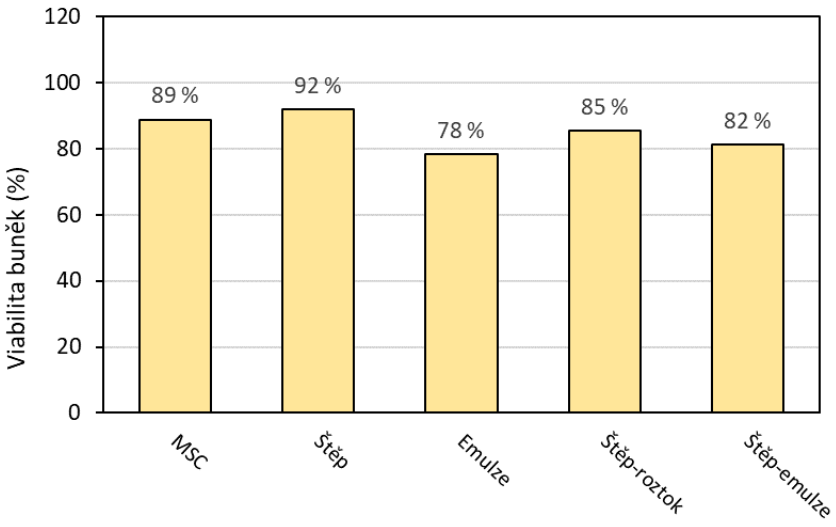
6.4 Prolifrace a viabilita mezenchymálních kmenových buněk

Byla testována proliferace a životaschopnost mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v přítomnosti emulze obsahující vodný roztok antibiotik ve vnitřní fázi. Jak je vidět na Obr. 22, proliferační aktivita v alogenní spongiózní kosti (štěpu) byla srovnatelná s kontrolní skupinou mezenchymálních kmenových buněk. Samotný kostní štěp představuje pro mezenchymální kmenové buňky přirozené mikroprostředí, proto měl na proliferaci stimulační účinek. Proliferace byla dokonce vyšší než v kontrolních skupinách. Jak bylo očekáváno, testované formulace v porovnání s kontrolním měřením snížily proliferaci a rovněž viabilitu. Z předchozích výsledků testování polymerních nosičů léčiv (Prochazka et al., 2010) je známo, že polymerní

nosiče smíchané s kostními štěpy jsou pro mezenchymální kmenové buňky a následné regenerační procesy přijatelnější. Po počátečním poklesu proliferace obvykle následuje její zvýšení za 7-10 dní. Emulze snížila viabilitu a proliferaci pod 80 % (78 %). V případě, kdy byla emulze testována v přítomnosti štěpu, byla viabilita zvýšena na 82 %, čímž byla překonána hranice 80 %, která je z hlediska viability MSC hraniční (Obr. 23). Tím je výsledek srovnatelný s roztokem, přestože u emulze byla s ohledem na přítomnosti emulgátorů očekávána vyšší toxicita než u roztoku.



Obrázek 22: Vliv emulze na proliferaci kmenových buněk

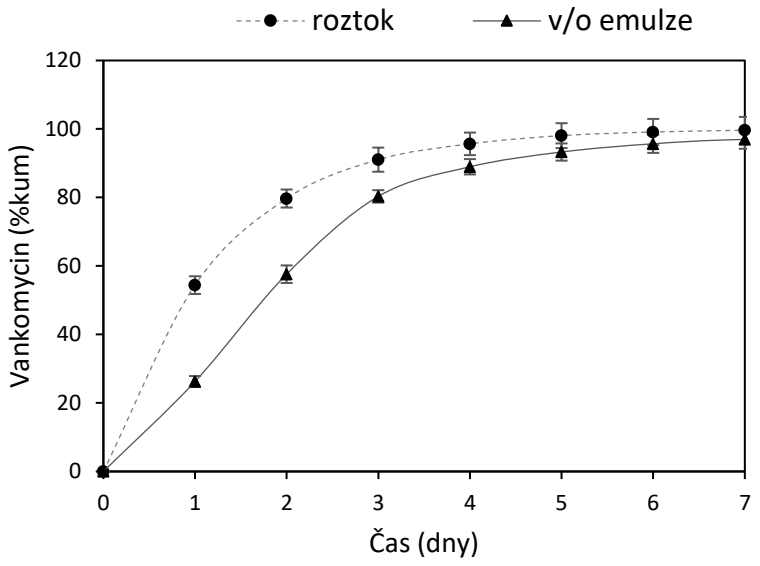


Obrázek 23: Vliv emulze na viabilitu kmenových buněk

6.5 Liberace antibiotik z kostních štěpů impregnovaných emulzí

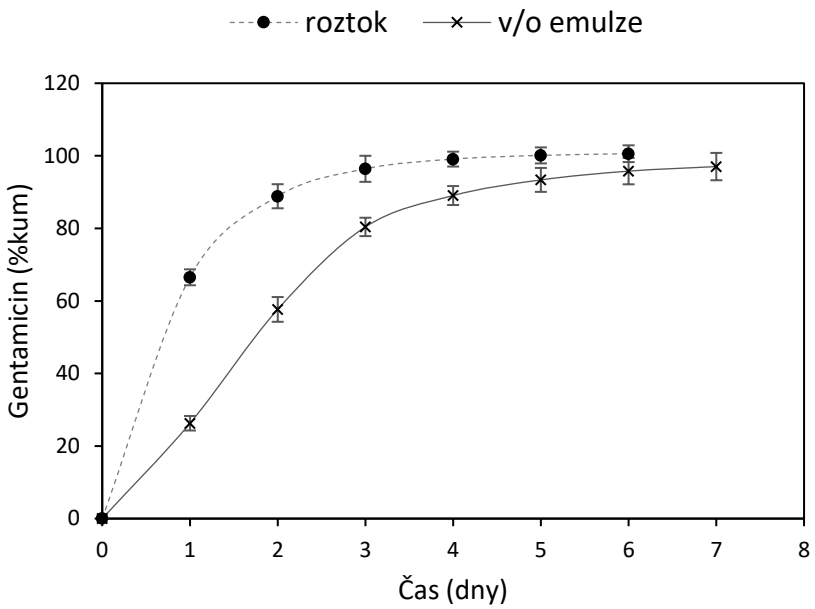
Morselizované alogenní kostní štěpy byly impregnovány emulzí s vankomycin-hydrochloridem a gentamycin-sulfátem. Pro test disoluce byla vybrána emulze E1 A (Tab. 1). Jedná se o emulzi s trikaprinem jako olejovou fází. Vnitřní fáze tvořila 30 % celkového objemu a obsahovala vodu na injekci s antibiotiky. Byla emulgována lecitinem (3,5 %) a sorbitan monooleátem. Liberace antibiotik vázaných ve vnitřní fázi byla individuálně porovnávána s liberací antibiotik z roztoku. V případě roztoku je prodloužené uvolňování dáno pouze vazbou na heterogenní povrch kostních štěpů. Uvolnění hydrofilního léčiva z emulze z hydrofobní kontinuální fáze je vedle vazby emulze na povrch štěpu dáno rozdělovacím koeficientem, který vychází z chemických vlastností léčiva. Dalšími faktory, které mohou profil liberace ovlivnit, je například délka impregnace štěpů nebo pH, při kterém impregnace probíhá.[7]

Na Obr. 24 je průběh liberace vankomycinu z emulze typu v/o. Při porovnání s roztokem se podařilo snížit iniciační uvolněné množství (potlačit burst efekt). Díky tomu je snížena potencionální toxicita a zátěž organismu plynoucí z vysoké nárazové dávky léčiva.



Obrázek 24: Liberace vankomycin-hydrochloridu z vodného roztoku a emulze v/o

Na Obr. 25 je analogicky sledována liberace gentamicinu.



Obrázek 25: Liberace gentamicin-sulfátu z vodného roztoku a emulze v/o

Lze konstatovat, že uvolňování obou antibiotik probíhalo velmi obdobně. Po necelých čtyřech dnech došlo k uvolnění více než 90 % z celkového navázaného množství. V případě roztoku se takové množství antibiotik uvolnilo již po 48 hodinách. Z grafu je rovněž patrné, že v průběhu prvních třech dní bylo uvolňování léčivé látky z emulze téměř lineární. Z toho lze soudit, že uvolňování léčiv probíhalo v této oblasti téměř kinetikou blízkou kinetice nultého řádu, kdy se léčivo uvolňuje nezávisle na celkové koncentraci navázaného léčiva. U testované emulze bylo dosaženo prodloužení eluce antibiotik cca o 48 hodin. Celkové množství inkorporovaných antibiotik se v případě emulze uvolnilo 6. den hodnocení.

7 Závěry

Byly formulovány emulze typu v/o, představující depotní lékovou formu pro lokální podání vankomycin-hydrochloridu a gentamicin-sulfátu. Struktura a stabilita emulzí byly hodnoceny na základě tokových vlastností emulzí.

Byl prokázán vliv typu emulgátoru na viskozitu testovaných emulzí. Emulze emulgované PGPR a Mg-stearátem vykazovaly tokové chování blízké newtonským kapalinám. Emulze emulgované lecitinem a sorbitan monooleátem vykazují vlivem namáhání významný pokles viskozity. S rostoucím rychlostním spádem dochází k prudkému poklesu viskozity. Emulze emulgované PGPR a Mg-stearátem mají vlivem všech testovaných formulačních faktorů viskozitu nižší než emulze, které byly emulgovány lecitinem a sorbitan monooleátem.

NaCl ve vnitřní vodné fázi emulze způsobil snížení viskozity. Emulze emulgované lecitinem a sorbitan monooleátem reagovaly na přídavek NaCl výraznější změnou viskozity než analogicky připravené emulze s PGPR a Mg-stearátem. Efekt zvýšení viskozity v závislosti na zvýšení poměru vnitřní fáze nebyl v rámci tohoto experimentu potvrzen.

Hodnocení tokových vlastností v závislosti na typu homogenizace prokázalo nejvyšší efektivitu homogenizace při použití ultrazvuku. S prodloužením doby, po kterou homogenizace probíhala, se viskozita dále zvyšovala.

Byla testována viabilita a proliferace kmenových kostních buněk a vliv antibiotik na potencionální poškození okolní tkáně. V kombinace s osteoindukčními vlastnostmi kostních štěpů je viabilita MSC zachována v dostatečné míře, tedy více než 80 %.

Liberace antibiotik *ex vivo* po impregnaci kostních štěpů emulzí vykazovala nižší burst efekt a došlo k prodloužení celkové doby liberace na 6 dní. V porovnání s roztokem se doba liberace prodloužila cca o 48 hodin.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Příklady nestability emulzí 22
Obrázek 2: Interakce proteinu s emulgátorem 24
Obrázek 3: Gelace vnitřní fáze 24
Obrázek 4: Molekula trikaprinu 26
Obrázek 5: Tokové *(a)* a viskozitní *(b)* křivky dle typu soustavy 28
Obrázek 6: Reopexní a tixotropní soustava 28
Obrázek 7: Popis viskozitní křivky 29
Obrázek 8: Matematické modely pro konkrétní oblasti 29
Obrázek 9: Emulze emulgované lecitinem a sorbitan monooleátem (vlevo) a PGPR a Mg-stearátem (vpravo) 35
Obrázek 10: SEM snímky kostních štěpů 39
Obrázek 11: Viskozitní křivky olejové fáze 41
Obrázek 12: Methylenová modř 44
Obrázek 13: Sudan III 44
Obrázek 14: Tokové vlastnosti emulze E1 modelované pomocí Power law modelu 45
Obrázek 15: Vliv způsobu homogenizace na viskozitu emulze s lecitinem a sorbitan monooleátem a 30 % vodné fáze 46
Obrázek 16: Tokové vlastnosti emulze s PGPR, 30 % (E2 B) 47
Obrázek 17: Tokové křivky emulzí s léčivy (E1 A, E3 A, E4 A) 48
Obrázek 18: Vliv NaCl na viskozitu emulze 50
Obrázek 19: Tokové křivky emulze s lecitinem, sorbitan monooleát, 30 %, (E3 B-E) 51
Obrázek 20: Průběh tokových křivek emulzí obsahujících PGPR, Mg-stearát, 40 %, NaCl (E4 B-D) 53
Obrázek 21: Závislost typu homogenizace na viskozitě emulzí s ohledem na typ použitého emulgátoru 55
Obrázek 22: Vliv emulze na proliferaci kmenových buněk 56
Obrázek 23: Vliv emulze na viabilitu kmenových buněk 56
Obrázek 24: Liberace vankomycin-hydrochloridu z vodného roztoku a emulze v/o 57
Obrázek 25: Liberace gentamicin-sulfátu z vodného roztoku a emulze v/o 58

9 Seznam použité literatury

[1] ZIMMERLI, W.: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology,* 2006, 20(6), ISSN 1045–1063.

[2] ROZSYPAL, H.: Základy infekčního lékařství. 2. vydání, 2015. Praha: Nakladatelství Karolinum, 572 s., ISBN 978-80-246-2956-8 online pdf, *Infekce kostí a kloubů: Infekce kloubní náhrady*, s. 324-325

[3] ARLEN D. HANSSEN, MD: Local Antibiotic Delivery Vehicles in the Treatment of Musculoskeletal Infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2005, 437, s. 91-96. ISSN 1528-1132

[4] SHIRWAIKER, R.A., SPRINGER, B.D., SPANGEHL, M.J., GARRIGUES, G.E., LOWENBERG, D.W., GARRAS, D.N., YOO, J.U., POTTINGER, P.S.: A clinical perspective on musculoskeletal infection treatment strategies and challenges. *J Am Acad Orthop Surg*, 2015, 23, s. 44-54. ISSN 1940-5480

[5] SIMCHI, A., TAMJID, E., PISHBIN, F., BOCCACCINI, A.R.: Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. *Nanomedicine*, 2011, 7(1), s. 22–39. ISSN 1178-2013

[6] SVOBODA M., GALLO J., MRŇKOVÁ M.: Antibiotika v kostním cementu, *Klin Farmakol Farm*, 2017; 31(4): s. 18–24. ISSN 1803-5353

[7] PEETERS A, PUTZEVS G, THORREZ L.: Current Insights in the Application of Bone Grafts for Local Antibiotic Delivery in Bone Reconstruction Surgery. *J Bone Jt Infect*, 2019. 15;4(5):245-253. ISSN 2206-3552

[8] AMBARD, A. J., MUENINGHOFF, L.: Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. *Journal of Prosthodontics*, 2006, 15(5), s. 321–328. ISSN 1059-941X

[9] COOK, G.E., MARKEL, D.C., REN, W., WEBB, L.X., McKEE, M.D., SCHEMITSCH, E.H.: Infection in Orthopaedics. *J Orthop Trauma,* 2015. 29 Suppl 12:S19-23. ISSN 1531-2291

[10] SHEN, S.C., WAI KIONG, N.G., ZHILONG, S., LEONARD CHIA; KOON GEE NEOH; R. BENG HEE TAN: Mesoporous silica nanoparticle-

functionalized poly(methyl methacrylate)-based bone cement for effective. *J Mater Sci Mater Med*, 2011. 22(10):2283-92. ISSN 1573-4838

[11] SONG, W., SETA, J., KAST, R., AUNER, G., CHEN, L., MARKEL, D., REN, W.: Influence of Particle Size and Soaking Conditions on Rheology and Microstructure of Amorphous Calcium Polyphosphate Hydrogel. *Journal of the American Ceramic Society*, 2015, 98(12), s. 3758-3769. ISSN 1551-2916

[12] DUAN, K., WANG, R.: Surface modifications of bone implants through wet chemistry. *Journal of Materials Chemistry*, 2006, 16(24), s. 2309–2321. ISSN 1364-5501

[13] ZHANG, B.G., MYERS, D.E., WALLACE, G.G., BRANDT, M., CHOONG, P.F.: Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7), s. 11878-11921. ISSN 1422-0067

[14] SONG, WEI; YU, XIAOWEI; MARKEL, D.C; SHI, TONG; REN, WEIPING: Coaxial PCL/PVA electrospun nanofibers: osseointegration enhancer and controlled drug release device. *Biofabrication*, 2013, 5(3), s. 035006. ISSN 1758-5090

[15] VAN VUGT, T. A. G., GEURTS, J., ARTS, J. J.: Clinical Application of Antimicrobial Bone Graft Substitute in Osteomyelitis Treatment, A Systematic Review of Different Bone Graft Substitutes Available in Clinical Treatment of Osteomyelitis. *Biomed Res Int*, 2016, (2016), s. 6984656. ISSN 2314-6141

[16] SCHLICKEWEI CW., YARAR S., RUEGER JM.: Eluting antibiotic bone graft substitutes for the treatment of osteomyelitis in long bones. A review: evidence for their use?. *Orthop Res Rev*, 2014, 6, s. 71-79. ISSN 1179-1462

[17] ANAGNOSTAKOS, K., SCHRODER, K.: Antibiotic-Impregnated Bone Grafts in Orthopaedic and Trauma Surgery A Systematic Review of the Literature, *International Journal of Biomaterials*, 2012, (2012), s. 53806. ISSN 1687-8787

[18] GITELIS, S., BREBACH, G.T.: The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 2002, 10(1), s. 53–60. ISSN 2309-4990

[19] McKEE, M. D., LI-BLAND, E. A., WILD, L. M., SCHEMITSCH, E. H.: A Prospective, Randomized Clinical Trial Comparing an Antibiotic-Impregnated Bioabsorbable Bone Substitute With Standard Antibiotic-Impregnated Cement Beads in the Treatment of Chronic Osteomyelitis and Infected Nonunion. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2010, 24(8), s. 483–490. ISSN 1531-2291

[20] SARKER, D.: Pharmaceutical Emulsions: A Drug Developer's Toolbag, 2013, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 185 s., ISBN 978-04-709-7683-8

[21] ŠKLUBALOVÁ Z. a kol.: Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie (2020), Univerzita Karlova, Karolinum, 1. vydání. ISBN 978-80-246-4582-7 (online.pdf)

[22] BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. 5. vydání, 2005. VŠCHT Praha, 245 s., ISBN 80-7080-579-X [cit. 2022-01-05]. www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obalka-1.html>

[23] PHARMAPPROACH: Pharmaceutical Emulsions: An Overview, k 25. 1. 2022 https://www.pharmapproach.com/pharmaceutical-emulsions-an-overview/

[24] MARTI-MESTRES, G., NIELLOUD, F.: Emulsions in Health Care Applications – An Overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2002, 23:1-3, s. 419-439. ISSN 1532-2351

[25] BARKAT, A., KHAN, B., NAVEED, A., MUHAMMAD, H., KHAN, H. M. M., WASEEM, K., MAHMOOD, T., RASUL, A., IQBAL, M., KHAN, H.: Basics of pharmaceutical emulsions: A review. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 2011, 525, s. 2715-2725. ISSN 1996-0816

[26] JAKUBEC, M., ČEJKOVÁ, J.: Emulze: Příprava a stabilizace, k 28.1.2022 https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwUA.pdf?redirected

[27] JOSHI, H.C., PANDEY, I.P., KUMAR, A., GARG, N.: A study of various factors determining the stability of molecules. *Adv. Pure Appl. Chem*, 2012, 1, s. 7-11. ISSN 0033-4545

[28] HÅKANSSON, A.: Emulsion Formation by Homogenization: Current Understanding and Future Perspectives. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2019, 10(1), s. 239–258, ISSN 1941-1421

[29] HAIJU-LAB: The working principle and use of vortex mixer, k 1.3.2022 https://www.haiju-lab.com/The-working-principle-and-use-of-vortex-mixer-id3323432.html

[30] BEHREND, O., AX, K., SCHUBERT, H.: Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry,* 2000, 7(2), s. 77-85. ISSN 1350-4177

[31] GOOARZI, F., ZENDEHBOUDI, S.: A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *Can J Chem Eng*, 2019, 97, s. 281-309. ISSN 1939-019X

[32] Hu, Yin-Ting & Ting, Yuwen & Hu, Jing-Yu & Hsieh, Shu-Chen: Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 25. ISSN 1021-9498

[33] RAVERA, F., DZIZA, K., SANTINI, E., CRISTOFOLINI, L., LIGGIERI, L.: Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020, 288, s. 102344. ISSN 0001-8686

[34] PREZIOSI, V., PERAZZO, A., CASERTA, S., TOMAIUOLO, G., GUIDO, S.: Phase Inversion Emulsification. *Chemical Engineering Transactions*, 2013, 32, s. 1585-1590. ISSN 2283-9216

[35] Adrea's Notebook and Journal: Emulsion, k 24.4.2022 https://adreasnow.com/Undergrad/Notes/Sem%206.%20Surface%20and%20Colloids/Emulsions/09a/

[36] RHEONICS: What are emulsion: examples, features, preparation and measurement, k 5.1.2022, https://rheonics.com/what-are-emulsions-examples-features-preparation/

[37] PRICHAPAN, N., McCLEMENTS, D. J., KLINKESORN, U.: Influence of rice bran stearin on stability, properties and encapsulation efficiency of polyglycerol polyricinoleate (PGPR)-stabilized water-in-rice bran oil

emulsions, *Food Research International*, 2017, 93, s. 26-32. ISSN 0963-9969

[38] JIANG, J., MEI, Z., XU, J., SUN, D.: Effect of inorganic electrolytes on the formation and the stability of water-in-oil (W/O) emulsions. Colloids and Surfaces A*: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, 429, s. 82–90. ISSN 1873-4359

[39] ATTWOOD, D., FLORENCE, A.T.: Physical Pharmacy, London: Pharmaceutical Press, 2008, 182 s., ISBN 978-0-85369-725-1

[40] GHOSH, S., ROUSSEAU, D.: Fat crystals and water-in-oil emulsion stability. *Current Opinion in Colloid & Interface Science,* 2011, 16(5), s. 421–431. ISSN 1359-0294

[41] BINKS, B. P., ROCHER, A.: Effects of temperature on water-in-oil emulsions stabilised solely by wax microparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 335(1), s. 94-104, ISSN 0021-9797

[42] RAVERA, F., DZIZA, K., SANTINI, E., CRISTOFOLINI, L., LIGGIERI, L.: Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020, 102344. ISSN 0001-8686

[43] ZHU, Q., PAN, Y., JIA, X., LI, J., ZHANG, M.,YIN, L.: Review on the Stability Mechanism and Application of Water-in-Oil Emulsions Encapsulating Various Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18, s. 1660-1675. ISSN 1541-4337

[44] ZEMBYLA, M., MURRAY, B.S., SARKAR, A.: Water-in-oil emulsions stabilized by surfactants, biopolymers and/or particles: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 104, s. 49-59. ISSN 0924-2244

[45] KOROLEVA, M., YURTOV E. V.: Effect of Ionic Strength of Dispersed Phase on Ostwald Ripening in Water-in-Oil Emulsions, *Colloid Journal, 2003*, 65(1), s. 40-43. ISSN 1608-3067

[46] O'SULLIVAN, M., HOWE, A. J., CLARKE, S. M., ROUTH, A. F.: Heteroaggregation of water-in-oil droplets: the effects of relative internal solute concentrations and size, *Soft Matter J,* 2011, 7(23), 11216. ISSN 1744-6848

[47] MRQUEZ, A. L., MEDRANO, A., PANIZZOLO, L. A., WAGNER, J. R.: Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate. *Journal of Colloid and Interface Science,* 2010, 341(1), s. 101–108. ISSN 1095-7103

[48] WRIGHT, J.C., BURGESS, D. J : Long Acting Injections and Implants, 2012 Londýn, Springer, ISBN 978-1-4614-0554-2, 556 s. MORAIS, J. M., BURGESS, D. J.: Micro and Nanoemulsions Controlled Release Parenteral Drug Delivery Systems, s. 221–238

[49] ESQUENA, J., SANKAR, SOLANS, C.: Highly Concentrated W/O Emulsions Prepared by the PIT Method as Templates for Solid Foams. Langmuir, 2003; 19(7), s. 2983–2988. ISSN 1520-5827

[50] Lecithin liquid, k 18.3.2022 https://www.ingredientstodiefor.com/item/Lecithin_Liquid/1352?category=25

[51] ZOU, H., ZHAO, N., LI, S., SUN, S., DONG, X., YU, C.: Physicochemical and emulsifying properties of mussel water-soluble proteins as affected by lecithin concentration, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 163, s. 180–189. ISSN 1879-0003

[52] RAVIADARAN, R., NG, M.H., MANICKAM, S., CHANDRAN, D.: Ultrasound-assisted water-in-palm oil nano-emulsion: Influence of polyglycerol polyricinoleate and NaCl on its stability. *Ultrason Sonochem*, 2019, 52, s. 353-363. ISSN 18732828

[53] PATEL, S., PANDEY, G., YADAV, S.K.: Review on nanoemulsion based drug delivery system, *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2018, 7(2), ISSN 2278-7496

[54] SIKORA, E.: Chemical Structure, caprilic/capric triglyceride, k 18.3.2022 https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-caprylic-capric-triglyceride_fig1_275847001/download

[55] PAN, L.G., TOMÁS, M.C., ANÓN, M.C.: Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *J Surfact Deterg* 2002, 5, s. 135–143

[56] ANISA, I., NOUR, A.: Affect of Viscosity and Droplet Diameter on water-in-oil (w/o) Emulsions: An Experimental Study. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2010, 62. ISSN 1307-6892

[57] AMERICAN LABORATORY: Getting the Complete Picture: How to Best Measure a Viscosity Flow Curve, k 20.1.2022 https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/187241-Getting-the-Complete-Picture-How-to-Best-Measure-a-Viscosity-Flow-Curve/

[58] HOLUBOVÁ, R.: Základy reologie a reometrie kapalin. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8. https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/120997/120374494.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[59] CROW: Flow properties of polymers, k 10.2.2022 http://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Viscosity2.html

[60] OHAREK, L.: Příprava a charakterizace magnetoreologických suspenzí s vysokou sedimentační stabilitou, diplomová práce, 2020, Vysoké učení technické v Brně, Brno, 65 s.

[61] Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická: Reologické vlastnosti polymerů, k 17.1.2022 https://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP2_lab_02.pdf

[62] A Basic Introduction to Rheology. www.malvern.com

[63] GUO, B., LIU, G.: Mud Hydraulics Fundamentals. Applied Drilling Circulation Systems, Gulf Professional Publishing, 2011, 272 s., ISBN 978-01-238-1958-1

[64] Malvern Instruments: A Basic Introduction to Rheology, k 20.1.2022 https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf

[65] Analyse_0005 - Sisko model fit for viscometry. www.malvern.com.

[66] PROCHAZKA, E., SOUKUP, T., HROCH, M., FUKSA, L., BRCAKOVA, E., CERMANOVA, J., KOLOUCHOVA, G., URBAN, K., MOKRY, J., MICUDA, S.: Methotrexate released in vitro from bone cement inhibits human

stem cell proliferation in S/G2 phase. *International Orthopaedics,* 2010, 34, ISSN 137–142

[67] KUCERA, T. *et al.*: Elution kinetics of vancomycin and gentamicin from carriers and their effects on mesenchymal stem cell proliferation: An in vitro study, *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2017, 18(1), s. 1–10. ISSN 1471-2474

[68] BALCAEN, M., STEYLS, J., SCHOEPPE, A., NELIS, V., VAN DER MEEREN, P.: Phosphatidylcholine-depleted lecithin: A clean-label low-HLB emulsifier to replace PGPR in w/o and w/o/w emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, 581, s. 836–846. ISSN 1095-7103

[69] SCHERZE, I., KNOTH, A., MUSCHIOLIK, G.: Effect of Emulsification Method on the Properties of Lecithin- and PGPR-Stabilized Water-in-Oil-Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology,* 2007, 27(4), s. 427-424. ISSN 1532-2351