

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

Katedra farmaceutické technologie



**OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY LIPOSOMŮ PRO**  
**CÍLENOU ANTIBIOTICKOU TERAPII**

OPTIMIZATION OF LIPOSOME PREPARATION FOR TARGETED  
ANTIBIOTIC THERAPY

Diplomová práce

Tereza Bušilová

Vedoucí práce: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Hradec Králové 2025

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

V Hradci Králové dne 15.5. 2025

Tereza Bušilová

Poděkování patří mému školiteli PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D., děkuji za odborné vedení mé diplomové práce a vstřícný přístup. Velmi bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině za podporu v průběhu studia a nejlepší zázemí, jaké jsem si mohla přát.

# Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	7
3	Úvod.....	8
4	Seznam použitých zkratk ..... 9	9
5	Teoretická část .....	10
5.1	Intracelulární bakterie .....	10
5.1.1	Strategie přežití intracelulárních bakterií v makrofázích.....	10
5.2	Léčba intracelulárních infekcí a její výzvy .....	11
5.2.1	Antibiotická léčiva .....	13
5.2.2	Antibiotická rezistence .....	14
5.3	Moderní terapeutické režimy .....	15
5.3.1	Antimikrobiální peptidy.....	15
5.3.2	Konjugáty protilátka – antibiotikum.....	16
5.3.3	Nanočástice .....	17
5.3.3.1	Pevné lipidické nanočástice .....	19
5.3.3.2	Polymerní nanočástice .....	19
5.3.3.3	Kovové nanočástice .....	19
5.3.3.4	Dendrimery .....	21
5.3.3.5	Liposomy .....	22
6	Cíl práce.....	31
7	Experimentální část.....	32
7.1	Použité suroviny .....	32
7.2	Použité přístroje .....	32
7.3	Použité metody .....	33
7.3.1	Příprava nanočástic .....	33
7.3.2	Charakterizace částic .....	36
7.3.3	Další zpracování nanočástic.....	36

8	Výsledky .....	38
8.1	Vliv lipidické formulace .....	41
8.2	Rehydratace .....	44
8.3	Složení organické fáze .....	45
8.4	Doba sonikace .....	46
8.5	Velikost částic a index polydisperzity vzorků obsahujících gentamicin ...	48
9	Diskuse.....	50
10	Závěr .....	55
11	Seznam obrázků.....	56
12	Seznam tabulek .....	57
13	Použitá literatura .....	58

# 1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Tereza Bušilová

Název diplomové práce: Optimalizace přípravy liposomů pro cílenou antibiotickou terapii

Liposomální nanočástice představují inovativní přístup v distribuci antibiotických léčiv. Díky svým vlastnostem se dokážou efektivně akumulovat v infikovaných tkáních, a to jak prostřednictvím pasivního, tak aktivního targetingu. To přispívá k výraznému omezení systémových nežádoucích účinků a také omezení působení léčiva na zdravé tkáně. V kontextu rostoucí antibiotické rezistence se tak nanočástice jeví jako slibný nástroj pro zajištění cílené a účinné antibiotické terapie.

Cílem experimentální práce bylo připravit liposomální nanočástice a optimalizovat jejich vlastnosti tak, aby byly vhodné pro enkapsulaci léčiva. Částice byly připravovány metodou tenkého filmu. Jako léčivo byl vybrán gentamicin. Byl hodnocen vliv složení lipidické formulace, organického rozpouštědla a dalších faktorů na velikost a polydisperzitu vzniklých nanočástic.

V rámci experimentální části bylo připraveno 16 vzorků liposomů a 3 vzorky obsahující enkapsulovaný gentamicin. Ze získaných hodnot vyplývá, že nanočástice s gentamicinem, které dosahovaly optimálních hodnot byly takové, u kterých byla jako rozpouštědlo použita směs methanolu a chloroformu v poměru 3:7. Z hlediska složení částic dosáhla optimálních hodnot formulace tvořená 70 % fosfatidylcholinu a 30 % cholesterolu. Pro správnou tvorbu částic bylo klíčové enkapsulovat roztok gentamicinu ve fosfátovém pufru, kvůli ochraně pH formulace.

**Klíčová slova:** Nanočástice, liposomy, antibiotika, biodegradovatelnost, targeting, makrofágy



### 3 Úvod

S rostoucí spotřebou antibiotických léků sledujeme v posledních desetiletích také významný rozvoj antibiotické rezistence. Ačkoli je terapeutická účinnost mnoha antibiotik dobře prokázána, jejich tradiční podávání může vést k nízké biologické dostupnosti v místě infekce a zároveň způsobit řadu vedlejších účinků. Neefektivní distribuce léčiva navíc přispívá k selekci rezistentních mikroorganismů.

Jednou z možností, jak těmto problémům čelit, je využití cílené antibiotické terapie, která směřuje léčivo přesně do místa patologického působení. Tato strategie může výrazně zvýšit účinnost léčby a zároveň snížit nežádoucí účinky na zdravé tkáně. V posledních letech se v této oblasti dostávají do popředí nanosystémy, které umožňují řízené uvolňování a přesné doručení léčiv. Mezi tyto nanosystémy patří liposomy, sférické vezikuly tvořené jednou nebo více fosfolipidovými dvojvrstvami, které obklopují vodný vnitřní prostor. Díky své fosfolipidové dvojvrstvě strukturálně připomínají biologické membrány a umožňují snadný transport jak hydrofilních, tak lipofilních látek.

Vlastností liposomálních nanočástic jako nosičů léčiv s výhodou využíváme mimo jiné u infekcí způsobených intracelulárními bakteriemi. Tyto bakterie mohou přežít a množit se uvnitř hostitelských buněk, čímž se částečně vyhýbají účinku běžně podávaných antibiotik. Mezi takové patogeny patří například *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* nebo *Francisella*. Konvenční antibiotika často selhávají kvůli své omezené schopnosti pronikat buněčnými membránami. Liposomy však mohou tuto překážku překonat, a to díky své schopnosti fúzovat s buněčnými membránami nebo být internalizovány endocytózou. Tím otevírají cestu k účinnější léčbě obtížně dostupných infekcí. Jako je tomu například v případě obligátních intracelulárních bakterií.

## 4 Seznam použitých zkratk

AAC – konjugát protilátka antibiotikum

AMPs – antimikrobiální peptidy

DLS – dynamický rozptyl světla

GENT – gentamicin

CCl<sub>3</sub> – chloroform

MeOH – methanol

MLVs – multilamelární vezikuly

NPs – nanočástice

PDI – index polydisperzity

PEG – polythylenglykol

PCh – fosfatidylcholin

PNPs – polymerní nanočástice

SD – směrodatná odchylka

SLNPs – pevné lipidické nanočástice

ULVs – unilamelární vezikuly

## 5 Teoretická část

### 5.1 Intracelulární bakterie

Některé skupiny bakterií mají schopnost proniknout do hostitelských buněk, kde se nejen množí, ale také mění fungování hostitelské buňky. Tím si zajišťují stabilní prostředí, které je jednak chrání před působky imunitního systému hostitele, ale rovněž jim umožňuje pokračovat v šíření infekce (Silva, Silva Pestana 2013).

Tyto patogeny, známé jako intracelulární bakterie, jsou významnými v klinické praxi a mají schopnost napadat téměř všechny druhy buněk hostitelského organismu. Velká část z těchto bakterií se zaměřuje především na myeloidní buňky, ovšem i buňky, které jsou součástí imunitního systému, jako jsou makrofágy, hrají významnou roli jako jejich cíle. Typickými představiteli této skupiny patogenů jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes* (Mitchell, Chen, Portnoy 2016). Některé studie však ukazují, že i známé extracelulární bakterie, jako *Staphylococcus aureus*, mohou využívat buňky jako prostředí k přežití a replikaci (Garzoni, Kelley 2009).

#### 5.1.1 Strategie přežití intracelulárních bakterií v makrofázích

Makrofágy, klíčové buňky vrozené imunity, jsou vybaveny řadou mechanismů, které slouží k eliminaci patogenů. Mezi tyto mechanismy patří fagocytóza, tvorba fagolyzozomů, produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, autofagie a indukce programované buněčné smrti. Intracelulární bakterie však vyvinuly sofistikované strategie, aby těmto obranným mechanismům unikly a mohly se množit uvnitř těchto buněk (Mitchell, Chen, Portnoy 2016).

Jednou z nejběžnějších strategií je modifikace fagozomu, aby bylo zabráněno jeho fúzi s lyzozomy, čímž bakterie získávají čas potřebný k přežití a množení. Například patogeny jako *M. tuberculosis* aktivně blokují maturaci fagozomů pomocí specifických efektorů, které inhibují klíčové hostitelské dráhy. Jiné bakterie, jako *L. monocytogenes*, se z fagozomu uvolňují do cytosolu, kde mohou využívat na živiny bohaté prostředí a zároveň se vyhnout účinkům fagolyzozomu. Tento únik je

často zprostředkován toxiny, jako je listeriolysin O, který narušuje membránu fagosomu (Cossart 2011; Mitchell, Chen, Portnoy 2016).

Podobně i rod *Francisella*, zahrnující významný patogen *F. tularensis*, představuje model intracelulární bakterie se strategií přežití v cytosolu makrofágů. Po fagocytóze se *F. tularensis* uvolňuje z fagosomu do cytosolu, kde se dokáže efektivně množit. Tento proces je umožněn mimo jiné sekrečním systémem typu VI, který zajišťuje degradaci fagozomální membrány (Celli, Zahrt 2013).

V cytosolu *F. tularensis* nejen uniká antimikrobiálním mechanismům makrofágů (například narušuje tvorbu reaktivních forem kyslíku), ale také manipuluje hostitelskou buněčnou signalizací, aby omezila rozpoznání vrozenou imunitou či jinými hostitelovými obrannými mechanismy (Celli, Zahrt 2013).

Tyto adaptace činí z rodu *Francisella* vysoce úspěšného intracelulárního patogena a přispívají k jeho schopnosti způsobovat těžká onemocnění, jako je tularémie (Mitchell, Chen, Portnoy 2016).

## **5.2 Léčba intracelulárních infekcí a její výzvy**

Lokalizace v buňkách hostitele chrání intracelulární patogeny nejen před působením imunity, ale také před účinky antibiotické léčby. Zajištění účinného přenosu antibakteriálních látek k bakteriím ukrytým uvnitř hostitelských buněk představuje zásadní výzvu. Tyto bakterie často způsobují závažná onemocnění, což zdůrazňuje význam moderních terapeutických přístupů zaměřených na efektivní distribuci léků přímo do infikovaných buněk (Wang et al. 2023).

Podle způsobu aplikace a umístění infekce musí léčiva například projít epitelem gastrointestinálního traktu, aby se dostala do krevního oběhu, překonat bariérové vlastnosti kůže při topických infekcích nebo proniknout sliznicí dýchacích cest při infekcích respiračních. V případě intracelulárních bakterií však terapie naráží na další překážku, jelikož léčiva musí projít membránou hostitelských buněk. Tento proces je nejčastěji zprostředkován procesem difúze nebo endocytózy. Ačkoliv je k dispozici řada antibiotik, většina z nich, konkrétně více než dvě třetiny, nedokáže účinně působit na intracelulární patogeny (Abed, Couvreur 2014).

Buněčná plazmatická membrána se skládá z lipidové dvojvrstvy, a je nepropustná pro většinu polárních nebo nabitých látek. Malé látky (< 700 Da) lipofilní povahy užívané k léčbě bakteriálních infekcí, jako jsou  $\beta$ -laktamy, makrolidy a chinolony, vstupují do buněk difúzí přes tuto membránu (Tulkens 1991). Pokud je molární hmotnost látky příliš velká nebo není schopna difundovat přes membránu z jiných důvodů, může se do buňky dostat pomocí endocytózy, jako je tomu například u aminoglykosidů. Tento proces zahrnuje internalizaci molekul v membránových vezikulách, které jsou následně internalizovány do buněk hostitele, kde je zapotřebí, aby bylo léčivo uvolněno do cytosolu (Varkouhi et al. 2011).

Nicméně, pro úspěšnou léčbu intracelulárních infekcí nestačí, aby antibakteriální látky pouze pronikly a zůstaly uvnitř hostitelských buněk, ale musí se také dostat do konkrétního subcelulárního prostoru, ve kterém se bakterie nacházejí (vezikuly nebo cytosol), a dosahovat zde dostatečných koncentrací. Přestože se tedy například makrolidy pomocí difuze dostanou do buňky, jsou odtud následně odstraňovány působením efluxní pumpy P-glykoproteinu (Seral 2003). Léčiva, která se dostávají do hostitelské buňky procesem endocytózy, mohou být z buňky vyloučena prostřednictvím exocytózy, pokud zůstanou uvnitř v endozomu. Oba tyto mechanismy brání antibiotikům dosáhnout patogenu (Kamaruzzaman, Kendall, Good 2017).

V případě některých patogenů, musí antibakteriální látky odolávat kyselému pH. Například bakterie rodu *Salmonella* se množí ve fagosomech, kde se pH pohybuje mezi 4,0 a 5,0 (Rathman, Sjaastad, Falkow 1996).

Intracelulární bakterie se mohou adaptovat na stresové prostředí hostitelských buněk tak, že přejdou do stavu, ve kterém se nereplikují nebo se replikují velmi pomalu. Například *M. tuberculosis* v hostiteli může vyvolat latentní infekce tím, že vstoupí do nereplikujícího stavu, což tento patogen činí odolný vůči běžně používaným antibiotikům. Tyto změny v metabolismu výrazně snižují účinnost antibiotik. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby antibiotika působila na bakterie v obou stavech – replikujícím i nereplikujícím (Grant, Hung 2013).

### 5.2.1 Antibiotická léčiva

V současné léčbě infekcí způsobených intracelulárními bakteriemi zůstávají běžná antibiotika léčivy první volby. Existuje řada antibiotik používaných k tomuto účelu, přičemž jejich volba a nutnost podání se liší v závislosti na konkrétním případě (Chen et al. 2024).

Například v terapii latentní tuberkulózy se zpravidla vybírá jedno až dvě antibiotika z těchto variant: isoniazid, pyrazinamid, ethambutol nebo rifampicin. Naopak u aktivní formy této nemoci, bývá kombinace několika léčiv nevyhnutelná, přičemž se často doporučuje zařazení fluorochinolonů, zejména v případech, kdy je infekce vyvolána rezistentními kmeny bakterií (Dheda et al. 2017).

Léčba infekcí vyvolaných bakterií *Salmonella* je ještě komplikovanější, některé výzkumy ukazují, že nevhodně zvolené léčivo může onemocnění zhoršit. Studie zjistila, že děti s infekcí způsobenou bakterií rodu *Salmonella* léčené ampicilinem nebo amoxicilinem měly vyšší pravděpodobnost delšího vylučování bakterií a opětovného návratu onemocnění ve srovnání s těmi, kterým bylo podáváno placebo. Z tohoto důvodu je nutné antibiotickou léčbu pečlivě zvažovat a podávat ji primárně pacientům s těžkým průběhem nemoci nebo těm, kteří mají zvýšené riziko šíření patogenů mimo střevní trakt (Chen et al. 2024).

Pečlivější analýza struktury antibiotik ukázala, že většina látek účinných proti intracelulárním bakteriím patří do těchto dvou kategorií:

1. **Malé molekuly** (100–300 Da), kam patří například isoniazid, pyrazinamid, ethambutol, sulfamethoxazol, chloramfenikol a beta-laktamy.
2. **Lipofilní antibiotika**, představované fluorochinolony, tetracyklíny, makrolidy a rifampicinem.

Obě tyto skupiny antibiotik mají schopnost dobře procházet buněčnými membránami a akumulovat se uvnitř buněk. Přestože jsou proti intracelulárním bakteriím účinnější než jiná antibiotika, je jejich aktivita stále markantně snížena oproti jejich působení na extracelulární kmeny bakterií (Chen et al. 2024).

Jedním z osvědčených přístupů ke zvýšení nitrobuněčné koncentrace léčiv je zvyšování jejich hydrofobicity. Vyšší hydrofobicita zlepšuje průchod léčiva přes

buněčnou membránu, a usnadňuje průnik antibiotika skrz lipidovou dvojvrstvu. Nedávné výzkumy vedly k vývoji hned několika hydrofobních derivátů běžně užívaných léčiv. Telavancin, což je hydrofobně modifikovaný vankomycin, prokázal lepší účinnost proti intracelulárnímu *S. aureus* než původní vankomycin. Také lipofilní derivát rifalog, vycházející z rifampicinu, vykázal více než tisícinásobně vyšší antibakteriální aktivitu proti intracelulárním bakteriím než rifampicin, přičemž jeho intracelulární akumulace byla více než stokrát vyšší (Chen et al. 2024).

Je však nutné mít na paměti, že příliš vysoká hydrofobicita může přinést komplikace, jako jsou snížená rozpustnost, biologická dostupnost a také zvýšená potenciální toxicita. Proto je klíčové najít rovnováhu mezi hydrofobicitou a farmakologickými vlastnostmi léčiva. Přestože hydrofobní antibiotika přinášejí v krátkodobém měřítku výhody, intracelulární bakterie mohou vůči nim rychleji vyvinout rezistenci. Kromě toho se ukázalo, že tato antibiotika nevykazují výrazně vyšší účinnost proti dormantním bakteriím. Proto zůstává vývoj nových terapeutických přístupů zaměřených na intracelulární patogeny nadále velmi důležitým cílem (Chen et al. 2024).

## **5.2.2 Antibiotická rezistence**

Jedním z hlavních problémů spojených s léčbou infekcí způsobených intracelulárními bakteriemi je narůstající výskyt antibiotické rezistence. Intracelulární bakterie se vyhýbají přímému působení některých antibiotik, která nejsou schopna účinně pronikat do buněčných kompartmentů. To často vede k použití širokospektrálních antibiotik nebo delším léčebným režimům, což může selektivně podporovat vznik rezistentních kmenů. Kromě toho bakterie, které se vyznačují dlouhými životními cykly, mají zvýšenou pravděpodobnost adaptace na antibiotickou léčbu prostřednictvím genetických mutací nebo horizontálního přenosu rezistenčních genů. Tento problém zdůrazňuje potřebu inovace léčiv zaměřené na specifické mechanismy přežití intracelulárních patogenů a efektivnějších strategií antibiotické terapie (Abed, Couvreur 2014).

### **5.3 Moderní terapeutické režimy**

Vzhledem k výzvám spojeným s použitím antibiotik při léčbě intracelulárních bakteriálních infekcí, které uvádíme výše, se stále více zkoumají nové antibakteriální látky, jako jsou například antimikrobiální peptidy (AMPs), nebo nové lékové formy stávajících léčiv, například konjugáty protilátek a antibiotik, a v neposlední řadě nanočástice (z angl. nanoparticles, NPs), které umožňují přesnější a efektivnější distribuci léčiv do buněk. Tyto lékové formy se vyznačují vysokou schopností procházet buněčnými membránami a různými antibakteriálními účinky. Pokrok v oblasti systémů nanodistribuce léků otevřel nové možnosti v boji proti intracelulárním bakteriím (Liu et al. 2020; Wang et al. 2023).

#### **5.3.1 Antimikrobiální peptidy**

AMPs jsou malé molekuly tvořené řetězcem aminokyselin, vzájemně se liší délkou tohoto řetězce (6 až 100 aminokyselin) i přítomnými aminokyselinami. Mají pozitivní náboj a amfipatickou povahu, což znamená, že obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní části. AMPs jsou produkovány všemi druhy živých organismů a jsou součástí jejich vrozené imunity. Tyto peptidy mají silnou schopnost ničit mikroorganismy, včetně multirezistentních, což vede k rostoucímu vědeckému a klinickému zájmu (Giuliani, Pirri, Nicoletto 2007).

U lidí patří mezi nejdůležitější vrozené AMPs katelicidiny a defenziny, vznikající v buňkách imunitního systému, a histatiny, které jsou produkovány a vylučovány do slin příušními, mandibulárními a submandibulárními slinnými žlázami (Peters, Shirtliff, Jabra-Rizk 2010).

I přes značnou strukturní rozmanitost působí většina AMPs proti patogenům přímo, a to narušením membrány a tvorbou pórů, což vede k úniku důležitých iontů a živin. Mechanismus a způsob průniku do membrány se může u různých peptidů lišit v závislosti na různých faktorech, jako jsou sekvence aminokyselin, složení lipidů v membráně či koncentrace AMPs. I když přesné mechanismy, jakými AMPs interagují s mikrobiálními membránami a činí je propustnými, nejsou plně objasněny, předpokládá se, že se AMPs vážou na cytoplazmatickou membránu a

vytvářejí struktury podobné micelám, což vede k jejich narušení (Peters, Shirliff, Jabra-Rizk 2010).

Nespornou výhodou AMPs je jejich selektivní toxicita vůči patogenům, vycházející z odlišností mezi buňkami hostitelů a mikrobiálními, jako je například složení membrány. AMPs mají jako terapeutika mnoho dalších možných výhod. Kromě své široké antimikrobiální účinnosti a schopnosti rychle eliminovat mikroorganismy dokážou neutralizovat endotoxiny a jsou odolné vůči běžným mechanismům antibiotické rezistence. Velký potenciál představuje synergické působení AMPs se stávajícími antibiotiky, kterým AMPs usnadňují průnik do mikrobiálních buněk. Na rozdíl od běžných antibiotik, k jejichž působení jsou bakterie často odolné, u AMPs nevzniká rezistence, což je pravděpodobně způsobeno nutností výrazných změn ve struktuře membrány, které by bakteriální buňka musela provést, aby se stala rezistentní (Haney, Mansour, Hancock 2017).

V současnosti jsou AMPs považovány za jeden z nejperspektivnějších směrů v boji proti infekcím a mikrobiální rezistenci na léky (Haney, Mansour, Hancock 2017).

### **5.3.2 Konjugáty protilátka – antibiotikum**

Monoklonální protilátky se osvědčily jako efektivní nástroje v oblasti diagnostiky nemocí, detekce malých molekul i léčby rakoviny (Scott, Wolchok, Old 2012). Díky jejich schopnosti specificky rozpoznávat antigeny se využívají i při terapii bakteriálních infekcí. Pokud antigen představuje faktor virulence, může protilátka působit jako antivirulentní látka a zmírnit škodlivé účinky bakteriální infekce. Například monoklonální protilátka MAB1 prokázala schopnost eradikovat *E. coli* tím, že narušila skládání membránových proteinů typu  $\beta$ -barrel, vedoucímu k destabilizaci vnější membrány (Storek et al. 2018).

Přestože jsou protilátky slibným terapeutickým nástrojem, jejich úzké spektrum účinku nebo problematické rozpoznávání některých bakteriálních antigenů mohou omezit jejich efektivitu jako prostředku samostatné léčby. Vzhledem k tomu, že antibiotika i protilátky mají své specifické výhody, jejich kombinace by mohla přinést nový, účinnější přístup k léčbě intracelulárních bakteriálních infekcí (Liu et al. 2020).

Jedním z inovativních řešení je konjugát protilátka-antibiotikum (z angl. antibody-antibiotic conjugate; AAC). Jeden z těchto konjugátů byl vyvinut k eliminaci intracelulárního *S. aureus*. Tento konjugát je tvořen specifickou protilátkou proti *S. aureus* spojenou s rifalogem (vysoce účinným derivátem antibiotika rifampicinu) prostřednictvím kovalentního linkeru citlivého na enzym katepsin, což je proteáza lokalizovaná v lyzozomech (Lehar et al. 2015). Tato metoda vychází z úspěšného konceptu konjugátů protilátka-léčivo, využívaného v onkologické léčbě (Scott, Wolchok, Old 2012).

Důležitou výhodou AAC je, že zůstávají neaktivní až do chvíle, kdy pronikají do hostitelské buňky, což umožňuje minimalizovat riziko rozvoje antibiotické rezistence tím, že aktivnímu léčivu nejsou vystaveny jiné bakterie. Jakmile se AAC dostane do infikované buňky díky specifické vazbě protilátky na antigen exprimovaný na její membráně, enzymy rozloží chemické vazby kovalentního linkeru a uvolní aktivní formu léčiva. V experimentálním modelu myši se tento přístup ukázal jako mnohem účinnější než dvě konvenčně užívaná antibiotika užívaná k léčbě infekcí způsobených *S. aureus* (Mariathasan, Tan 2017).

Navzdory nespornému potenciálu této strategie existují určité překážky bránící jejímu užití v klinické praxi. Zůstává nejasné, zda bude účinnost AAC u lidí srovnatelná s úspěchem u myši, nebo zda vlastní protilátky pacienta nebudou interferovat s účinkem AAC. Také je otázkou, zda imunitní systém člověka nebude AAC vnímat jako cizorodou látku a nevyvolá proti němu imunitní odpověď (Liu et al. 2020).

V budoucnu se snad tyto otázky podaří objasnit a AAC by se mohly stát běžnou a slibnou součástí klinické léčby.

### **5.3.3 Nanočástice**

NPs jsou struktury menší než 100 nm připravené z kovových, oxidových, polovodičových, lipidických, polymerních nebo uhlíkových materiálů (Hajipour et al. 2012). Jejich terapeutický potenciál dokládá množství nanoléčiv schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. Mezi lety 2001 a 2021 procházelo klinickými studiemi přes 480 nanoformulací léčiv, z nichž 64 již bylo Úřadem pro kontrolu

potravin a léčiv schváleno (Namiot et al. 2023). Některé z těchto NPs mají výrazné antibakteriální vlastnosti a také mohou zvyšovat účinek antibiotik. Například studie z roku 2012 dokazuje, že NPs oxidu zinečnatého, oxidu měďnatého a oxidu železitého účinně působí proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (Azam et al. 2012).

Přestože jsou NPs oproti běžným molekulám léčiv podstatně větší, dokáží zlepšovat schopnost těchto antibiotik pronikat do buněk. NPs přispívají k efektivní distribuci léčiv v rámci buněk a jejich cílenému doručování do specifických tkání. Předpokládá se, že do savčích buněk vstupují procesem fagocytózy nebo pinocytózy, což z nich činí užitečný nástroj v léčbě intracelulárních bakteriálních infekcí (Abed, Couvreur 2014).

NPs mohou být také dále modifikovány. Mezi modifikovatelné typy NPs patří lipozomy, polymerní NPs, pevné lipidové NPs a dendrimery. Tyto systémy lze na povrchu uzpůsobit tak, aby nesly specifický náboj či struktury, což umožňuje jejich propojení s různými molekulami, jako jsou léčiva, protilátky, proteiny nebo oligonukleotidy. NPs lze dále vybavit materiály reagujícími na specifické podněty, například na změny pH či teploty. Pomocí těchto modifikací jsme schopni kontrolovat například místo uvolnění léčiva. Díky těmto možnostem reprezentují NPs slibnou technologii pro zlepšení distribuce známých antibiotik do infikovaných buněk (Zhang et al. 2010).

Důležitou funkci v osudu NPs v lidském organismu představují makrofágy, buňky imunity specializované pro internalizaci cizorodých částic. Makrofágy se tak podílejí i na absorpci a transportu NPs, jelikož aktivně internalizují částice v rozmezí velikostí od 20nm po 350 nm. Proces internalizace může být ovlivněn i dalšími vlastnostmi formulace, jako je náboj nebo tvar částic. Makrofágy zároveň poskytují vhodné životní prostředí pro intracelulární mikroorganismy (viz kapitola 5.1.1), a tak lze jejich schopnosti internalizace NPs s výhodou využít, pokud do těchto částic enkapsulujeme léčivo cílené proti patogenu (Colino, Lanao, Gutierrez-Millan 2020).

### **5.3.3.1 Pevné lipidické nanočástice**

Pevné lipidické nanočástice (z angl. solid lipid nanoparticles; SLNPs) jsou částice, které představují přechod mezi liposomy a polymerními NPs. SPLNPs jsou vyrobeny z biologicky odbouratelných pevných přírodních nebo syntetických lipidů. Na rozdíl od liposomů, SLNPs nemají dvouvrstvou strukturu, ale jsou tvořeny pevným matricemi stabilizovanými surfaktanty. Výhody SLNPs zahrnují dlouhodobou stabilitu, dobrou biokompatibilitu, snadné použití a enkapsulaci hydrofilních i lipofilních léků (Arana, Gallego, Alkorta 2021; Wang et al. 2023).

### **5.3.3.2 Polymerní nanočástice**

Polymerní nanočástice (PNPs) jsou slibnou lékovou formou pro dodávku antibiotik díky své biokompatibilitě a strukturní rozmanitosti materiálů pro jejich přípravu. Mezi přírodní polymery patří látky jako albumin, kolagen, chitosan, hemoglobin a alginát. Syntetické polymery zahrnují sloučeniny, jako jsou polyamidy, polymery na bázi aminokyselin, kyanoakryláty, polyestery a ortoestery (Wang et al. 2023).

Racionálně navržené PNPs mohou účinně distribuovat léky na cílená místa a umožnit kontrolované uvolňování léků podle potřeb pacienta, což může být efektivní způsob léčby u obtížně léčitelných intracelulárních bakteriálních infekcí. Jiang et al. vyvinuli PNPs pomocí formulace voda-olej-voda obsahující gentamicin (GENT). Tyto částice, prokázaly, že po fagocytóze makrofágy infikovanými *K. pneumoniae* a transportu do intracelulárního bakteriálního rezervoáru výrazně snižují vitalitu bakterií, aniž by stimulovaly prozánětlivé nebo proapoptotické signální dráhy hostitele. PNPs byly dříve použity i pro dodávku antibiotik k eradikaci intracelulárních chlamydií (Chen et al. 2024).

### **5.3.3.3 Kovové nanočástice**

NPs na bázi kovů, jako jsou zlato, stříbro či měď, mají širokospektrální antibakteriální účinky proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím. Jelikož je povrch buněčné stěny těchto patogenů záporně nabitý, mohou se kladně

nabité kovové nanočástice pevně adsorbovat na buněčnou membránu pomocí elektrostatických interakcí. To zvyšuje propustnost membrány a narušuje její funkci. Kromě toho mohou kovové ionty pronikat do savčích buněk, kde generují reaktivní formy kyslíku, fototermální nebo fotodynamické efekty, což zesiluje jejich antibakteriální účinek (Balderrama-González et al. 2021).

Kovové nanomateriály se vyznačují velkým specifickým povrchem, snadnou modifikovatelností a vysokou stabilitou, což je činí ideálními nosiči antibiotických léčiv (Gharpure, Akash, Ankamwar 2020).

Zlaté nanočástice jsou mezi kovovými nanomateriály populární díky jejich silnému antibakteriálnímu účinku a výborné biokompatibilitě. Lze je snadno vyrábět v různých tvarech, jako jsou sféry, tyčinky nebo klece, a nadále snadno modifikovat. Zlato působí proti bakteriím několika mechanismy. Dokáže zasahovat do dýchacího řetězce bakterií, nebo ovlivnit enzymy podílející se na energetickém metabolismu (Gharpure, Akash, Ankamwar 2020).

Výzkumníci zkoumají kombinaci zlatých NPs s antibiotiky, čímž zvyšují jejich účinnost. Například syntéza NPs, jejichž součástí byl vankomycin navázaný na zlaté ionty, umožnila zvýšit jeho antibakteriální aktivitu proti bakteriím odolným vůči běžné léčbě, jako jsou vankomycin-rezistentní enterokoky (Balderrama-González et al. 2021).

Další studie ukázaly, že zlaté NPs mohou být využity i jako nosiče jiných antibiotik, například GENT. Fosfatidylcholinem (z angl. phosphatidylcholine; PCh) modifikované NPs naložené GENT byly schopny proniknout do makrofágů a snížit počet intracelulárních bakterií, jako jsou *P. aeruginosa* a *L. monocytogenes*, což potvrzuje jejich účinnost v boji proti intracelulárním infekcím (Mu et al. 2016).

Stříbrné NPs jsou dalším dobře známým antibakteriálním materiálem. Jejich účinnost spočívá ve schopnosti vyvolat oxidační stres, narušit syntézu buněčné stěny, zvýšit propustnost membrány a destabilizovat ribozomy bakterií (Bruna et al. 2021). Nicméně jejich nevýhodou je tendence k agregaci, což snižuje jejich účinnost. Vědci proto vyvinuli hybridní NPs, které kombinují stříbro se zlatem, čímž se zvýšila jejich stabilita a antibakteriální aktivita (Kyaw et al. 2017).

Měď a její sloučeniny, jako oxid měďnatý a oxid měďný, se rovněž široce využívají díky své nízké toxicitě a schopnosti narušovat buněčné membrány, poškozovat bakteriální DNA, inhibovat syntézu proteinů a blokovat klíčové metabolické dráhy bakterií. Výzkumy ukazují, že slitiny stříbra a mědi (Ag–Cu) mají silnější antibakteriální účinky než samotné jednotlivé kovy, což je dáno kombinovaným působením iontů  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$  (Wang et al. 2023).

Celkově mají kovové NPs široké využití v antibakteriální terapii, ať už samostatně, nebo v kombinaci s antibiotiky, kde mohou výrazně zvýšit jejich účinnost a pomoci v boji proti rezistentním bakteriím (Wang et al. 2023).

#### **5.3.3.4 Dendrimery**

Dendrimery jsou speciální sférické makromolekuly s pravidelnou a vysoce organizovanou strukturou, které se vytvářejí postupnými syntetickými kroky. Strukturně se skládají ze tří hlavních částí: centrálního jádra, vrstev rozvětvených jednotek vycházejících z jádra a funkčních skupin ve vnější vrstvě (García-Gallego et al. 2017).

Existují dva hlavní způsoby syntézy dendrimerů. Divergentní přístup začíná od centrálního jádra a směrem ven postupně buduje větvící se struktury pomocí opakovaných reakcí. Tento proces vyžaduje přebytek reaktantů, aby se zajistila úplná aktivace všech funkčních skupin. Nevýhodou tohoto postupu je, že s rostoucím počtem generací může dojít k neúplné reakci nebo vedlejším reakcím, což komplikuje purifikaci výsledných dendrimerů. Naopak konvergentní přístup začíná od vnějších částí a postupně směřuje k jádru. Nejprve se vytvářejí menší větvící se fragmenty, které se poté spojují s multifunkčním jádrem, čímž vzniká výsledný dendrimer. Tento přístup umožňuje snazší čištění konečného produktu, nicméně je obtížné syntetizovat dendrimery vyšších generací (Boas, Heegaard 2004).

Dendrimery jsou díky své vysoce rozvětvené struktuře a velkému povrchu ideální pro transport antimikrobiálních léčiv. Mohou nést jak hydrofobní, tak hydrofilní látky – hydrofobní léčiva jsou ukládána do vnitřních dutin, zatímco hydrofilní látky

se vážou na povrch pomocí kovalentních vazeb nebo elektrostatických interakcí (Gillies, Frechet 2005).

Některé dendrimery mají antimikrobiální vlastnosti ze své podstaty. Například dendrimery, jež mají na vnějším povrchu navázané funkční skupiny, jako kvartérní amoniové soli, které narušují bakteriální membrány. Díky vysoké hustotě těchto aktivních složek na povrchu dendrimerů jsou tyto látky účinnější než běžná antibiotika. Polykationická povaha těchto dendrimerů umožňuje jejich vazbu na negativně nabitě bakteriální membrány, což vede ke zvýšení propustnosti membrány, úniku iontů a k destrukci bakterie (Zhang et al. 2010).

Různá antimikrobiální léčiva byla úspěšně inkorporována do dendrimerních NPs, což vedlo ke zvýšení jejich terapeutické účinnosti. Díky těmto vlastnostem se dendrimery ukazují jako slibná léčivá forma pro inovativní antibakteriální terapie (Zhang et al. 2010).

### **5.3.3.5 Liposomy**

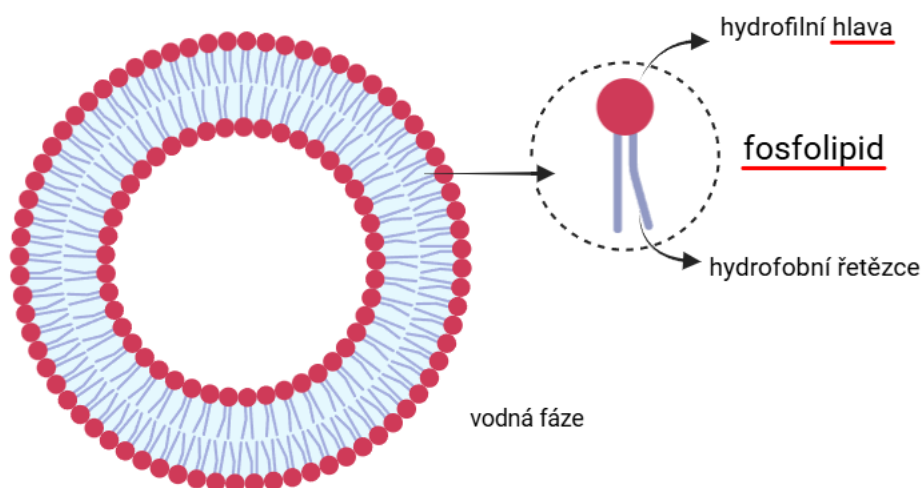
Liposomy jsou sférické váčky ohraničené molekulami amfifilních lipidů, které tvoří dvojvrstvou membránu. Jejich struktura byla poprvé popsána v roce 1965 a v 70. letech 20. století byly navrženy jako nanoplatforma pro distribuci léčiv. Po intenzivním výzkumu jejich vlastností, včetně interakcí lipidů s proteiny a léčivy či mechanismů jejich distribuce v těle, bylo v 80. letech potvrzeno jejich využití jako nosičů léčiv. To vedlo k jejich postupnému zavádění do praxe (Zhang et al. 2010).

#### ***Charakteristika***

Účinnost liposomů při transportu léčiv je ovlivněna především fyzikálně-chemickými vlastnostmi jejich membrán, složením, velikostí, povrchovým nábojem a uspořádáním lipidů (Bozzuto, Molinari 2015).

Hlavní složkou liposomů jsou fosfolipidy – amfifilní molekuly s hydrofilní hlavou a dvěma hydrofobními postranními řetězci. Při jejich disperzi ve vodném prostředí mají přirozenou tendenci vytvářet membrány, kde polární hlavy směřují do vodného prostředí a hydrofobní řetězce se navzájem přitahují (Obrázek 1). Tento proces vede ke vzniku lipidových dvojvrstev, jejichž vnitřní lipofilní prostor funguje jako

ochranná bariéra proti průniku látek dovnitř a vně (Li et al. 2015). Stabilitu těchto struktur zajišťují hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly mezi lipidovými řetězci. Finální uspořádání lipidů je dáno jejich složením, koncentrací, teplotou a tvarem molekul. Pokud jsou v průběhu vzniku liposomů přítomny ionty nebo jiné molekuly, mohou být v těchto strukturách enkapsulovány (Bozzuto, Molinari 2015).



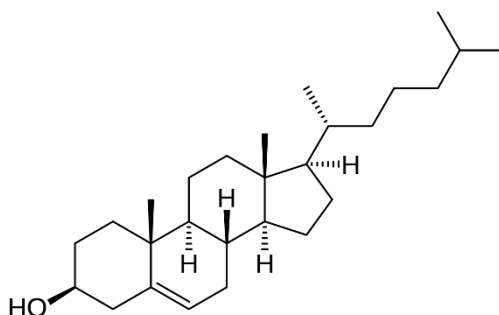
*Obrázek 1: Schéma jednoduchého unilamelárního liposomu. Liposom je tvořen fosfolipidy, jejichž hydrofilní části jsou orientovány směrem k vodnému prostředí a hydrofobní řetězce směřují k sobě.*

*Zdroj: vlastní zpracování*

Liposomy se klasifikují na základě způsobu přípravy (například reverzní fázová evaporace nebo extruze), velikosti (malé, střední, velké) a počtu vrstev (unilamelární, oligolamelární, multilamelární) (Bozzuto, Molinari 2015; Nsairat et al. 2022).

Unilamelární vezikuly (ULVs) mají jednu lipidovou dvojvrstvu a velikost mezi 50–250 nm, což je činí vhodnými pro transport hydrofilních léčiv. Naopak multilamelární vezikuly (MLVs) mají dvě a více vrstev a dosahují velikosti 1–5  $\mu\text{m}$ , což z nich činí ideální nosiče pro lipofilní látky. Vznik určitého typu liposomů se odvíjí od metod použitých k jejich přípravě a jejich dalšího zpracování. ULVs a MLVs se liší také rychlostí uvolňování léčiv – díky menší velikosti a tenčí membráně ULVs uvolňují svůj obsah rychleji než vícevrstvé MLVs (Bozzuto, Molinari 2015; Nsairat et al. 2022; Zhang et al. 2010).

Díky rostoucímu zájmu o zlepšení stability, farmakokinetiky a terapeutické účinnosti liposomů vznikly další generace liposomů. Tyto inovativní formulace mají upravené složení, velikost a povrchový náboj. Přidáním cholesterolu do lipidové membrány se snižuje propustnost liposomů a zvyšuje jejich stabilita. Díky svému hydrofobnímu charakteru interaguje cholesterol s jádrem membrány a přispívá k jejímu zpevnění (Obrázek 2). Kromě toho může sloužit jako kotvící prvek pro další molekuly, jako jsou polyethylenglykol (PEG) nebo DNA, což umožňuje využití liposomů například v biosenzorech nebo cíleném transportu léčiv (Zhang et al. 2010).



Obrázek 6: struktura cholesterolu

Další metodou stabilizace je použití PCh s nasycenými mastnými kyselinami a jiných látek, které zvyšují bod tání lipidů nad 37 °C. Klíčovým krokem k prodloužení doby cirkulace liposomů v krevním řečišti bylo navázání hydrofilních sacharidů nebo polymerů jako je PEG na povrch liposomů. PEGylace liposomů prodlužuje jejich cirkulaci a zároveň snižuje rozpoznání imunitním systémem. Dále lze koncové řetězce PEG modifikovat pro navázání specifických ligandů nebo monoklonálních protilátek, což umožňuje přesné cílení na určité buňky či patogeny (Bozzuto, Molinari 2015).

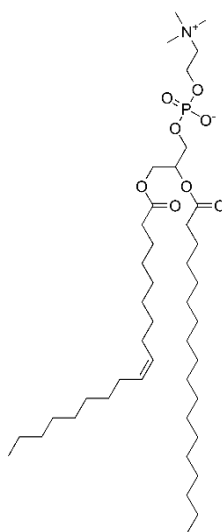
### ***Složení***

Složení lipidů výrazně ovlivňuje vlastnosti liposomů, jako jsou velikost částic, rigidita, fluidita, stabilita a elektrický náboj. Například liposomy vytvořené z přírodního nenasyceného PCH, jako je vaječný nebo sójový PCH, vykazují vysokou

propustnost, ale nižší stabilitu. Naopak liposomy založené na nasycených fosfolipidech, jako je dipalmitoylfosfatidylcholin, vytvářejí rigidní a téměř nepropustné dvojvrstvé struktury (Li et al. 2015).

Hydrofilní skupina v lipidech může být záporně nebo kladně nabitá nebo zwitteriontová (obsahuje kladný i záporný náboj v jedné molekule). Náboj hydrofilní skupiny přispívá ke stabilitě liposomů prostřednictvím elektrostatického odpuzování. Hydrofobní část lipidů se liší délkou acylového řetězce, symetrií a stupněm nasycení. Lipidy používané při přípravě liposomů lze klasifikovat jako:

1. **Přírodní lipidy**, které lze získat z různých zdrojů, například ze sójových bobů nebo vaječného žloutku. Membránová dvojvrstva běžných buněk se skládá především z glycerofosfolipidů. Ty obsahují glycerol jako základní strukturu, ke které je připojena fosfátová skupina ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) a dvě mastné kyseliny, jedna nasycená a druhá nenasycená. Fosfátová skupina může být dále spojena s malou, esenciální organickou molekulou, jako je cholin. Podle molekuly tvořící tuto polární hlavu se dělí na PCh (Obrázek 3), fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylglycerol a kyselinu fosfatidovou. V porovnání se syntetickými fosfolipidy jsou přírodní fosfolipidy při přípravě liposomů méně stabilní, což je způsobeno přítomností nenasycených uhlovodíkových řetězců (Li et al. 2015).



Obrázek 7: struktura PCh

2. **Syntetické lipidy** vznikají úpravou jak hydrofobních, tak hydrofilních částí přírodních fosfolipidů, což umožňuje vytváření široké škály specifických a klasifikovaných molekul. Mezi nejužívanější nasycené syntetické fosfolipidy patří ty, které obsahují stearovou nebo palmitovou kyselinu (Li et al. 2015).
3. **Steroidy** patří mezi hydrofobní lipidy a jsou tvořeny čtyřmi propojenými kruhy, jejich rozmanitost se odvíjí od funkčních skupin připojených k této základní struktuře. Nejčastěji využívaným steroidem při přípravě liposomů je cholesterol, který by ve výsledku neměl tvořit více než 30 % celkového množství lipidů. Jeho přítomnost v lipidové dvojvrstvě liposomů zajišťuje větší stabilitu a mechanickou pevnost (Briuglia et al. 2015).
4. **Surfaktanty**, neboli povrchově aktivní látky, se přidávají do liposomálních formulací za účelem optimalizace enkapsulace a řízeného uvolňování léčiv, a to snížením povrchového napětí mezi nemísitelnými složkami. Jedná se o amfifilní látky s jediným acylovým řetězcem, které narušují lipidovou dvojvrstvu liposomálních nanočástic, čímž zvyšují jejich schopnost deformace, čehož se široce využívá mimojiné u kožních lékových forem (umožňují lepší průchod léčivo přes kožní bariéru). Mezi často používané surfaktanty při přípravě liposomů patří sodná sůl cholové kyseliny, Span 60, Span 80, Tween 60 a Tween 80 (Nsairat et al. 2022).

Liposomy mohou být klasifikovány podle svého složení a funkcí do několika kategorií:

1. **Konvenční liposomy**, syntetizované z přírodních či syntetických fosfolipidů, mohou a nemusí obsahovat přidaný cholesterol. Představují první generaci liposomů. Tyto liposomy vykazují poměrně krátkou cirkulaci v krevním oběhu kvůli své náchylnosti k eliminaci makrofágy, a také limitovanou stabilitu in vitro. Tato omezení vedla k vývoji stabilních „stealth“ liposomů (Nsairat et al. 2022).
2. **Nabité liposomy** mají lepší stabilitu, jelikož vzájemné odpuzování nabitých částic brání jejich agregaci. Kationtové liposomy jsou často využívány v

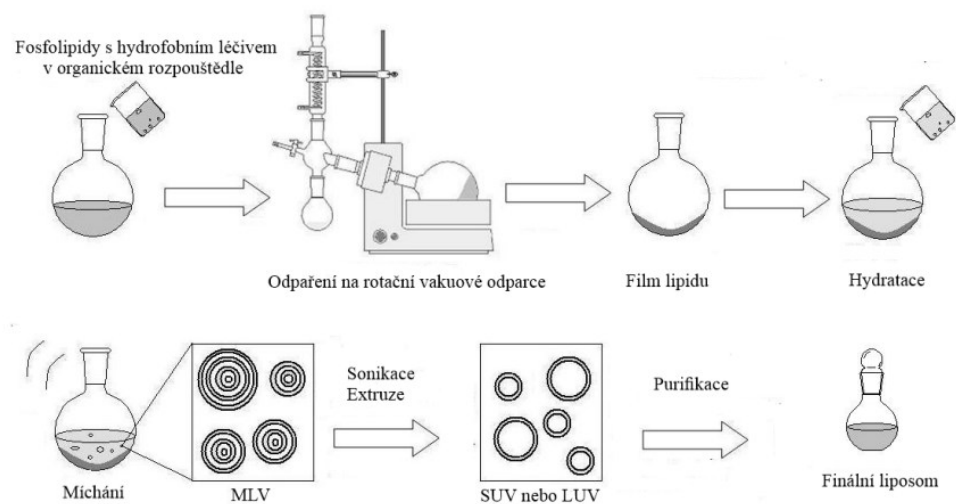
genové terapii, protože elektrostaticky vážou nukleové kyseliny a umožňují jejich efektivní enkapsulaci (Bozzuto, Molinari 2015; Nsairat et al. 2022).

3. **Stabilní „stealth“ liposomy**, neboli liposomy druhé generace, jsou upraveny na povrchu syntetickými polymery, glykoproteiny, polysacharidy nebo specifickými ligandy, což zajišťuje přesnější distribuci a cílené ukládání v požadovaných tkáních. Mezi nejúčinnější látky poskytující sterickou ochranu liposomů patří polyvinylalkohol a PEG (Bozzuto, Molinari 2015; Nsairat et al. 2022; Zhang et al. 2010).
4. **Aktivně cílené liposomy** představují liposomy třetí generace. Aktivní cílení zvyšuje selektivitu vůči napadeným buňkám a spouští receptorově zprostředkovanou endocytózu těmito buňkami. Možnost cílené distribuce liposomů lze vylepšit začleněním molekulárních rozpoznávacích prvků, využívá se jednoduchých peptidů, proteinů (včetně protilátek) nebo jejich fragmentů, sacharidů, nukleových kyselin či vitamínů (Bozzuto, Molinari 2015).
5. **Liposomy reagujících na specifické podněty** jsou systémy, které umožňují rychlé uvolnění terapeutických látek při vystavení fyzikálně-chemickým nebo biochemickým podnětům. Tyto liposomy obsahují složku, která ovládá stabilitu a propustnost lipidové dvojvrstvy. Existují dva základní typy indukce: vzdálené a lokální. Vzdálené indukce reagují na vnější podněty, jako je teplo, magnetické pole, světlo, elektrické pole a ultrazvuk. Lokální spuštění reaguje na podněty uvnitř cílových tkání, jako je pH, redoxní potenciál a přítomné enzymy (Bozzuto, Molinari 2015).

### ***Příprava***

Liposomy lze připravovat různými způsoby. Typ procesu a druh použitých fosfolipidů zásadně ovlivňují konečné vlastnosti liposomů. Zde uvádíme několik možných postupů:

1. **Metoda tenkého filmu** patří mezi nejčastěji používané postupy při přípravě liposomů. Spočívá ve vytvoření tenké vrstvy lipidů na vnitřní straně baňky rotační odparky, která se následně hydratuje vodným nebo pufrovým roztokem. Aby se usnadnila tvorba lipidové dvojvrstvy, je před hydratací důležité predehřát jak lipidový film, tak i roztok na teplotu vyšší, než je teplota fázového přechodu lipidů. Následný proces intenzivního třepání spolu s případnou sonikací v ultrazvukové lázni pomáhá uvolnit film z povrchu baňky a umožňuje vznik liposomů, přičemž výsledkem jsou MLVs různých velikostí. Přidání enkapsulovaného léčiva závisí na jeho povaze – lipofilní sloučeniny se mísí s lipidy ještě před vytvořením tenkého filmu, zatímco hydrofilní složky se přidávají do vodného nebo pufrového roztoku. Hlavní předností této metody je její vysoká opakovatelnost i při práci s malým množstvím látek. Na druhou stranu její nevýhodou je nízká účinnost enkapsulace, což ji činí vhodnou spíše pro zapouzdření lipofilních látek v malých dávkách (Šturm, Poklar Ulrich 2021). Schéma přípravy liposomů metodou tenkého filmu je znázorněno na obrázku 3(Arajo Lopes et al., 2013).



Obrázek 8: Schéma přípravy liposomů metodou tenkého filmu. Převzato a upraveno z Arajo Lopes et al., 2013.

2. **Metoda reverzního odpařování** se často využívá jako alternativa k metodě tenkého filmu a je založena na tvorbě emulze typu voda v oleji. Lipidy jsou rozpustěny v organickém rozpouštědle, které se následně smíchá s vodnou fází obsahující hydrofilní léčivo. Odpařením organického rozpouštědla na rotační odparce dochází k tvorbě lipidových vezikul rozptýlených ve vodném roztoku. Velikost a polydisperzitu vzniklých liposomů lze následně snížit extruzí. Tato metoda je vhodná zejména pro molekuly s vysokou molekulovou hmotností, avšak terapeutické sloučeniny mohou být během procesu denaturovány v důsledku působení organických rozpouštědel a sonikace (Dua, Rana, Bhandari, 2012).
3. **Injekční metody** jsou klasifikovány podle typu použitého organického rozpouštědla. Lipidy a hydrofobní účinné látky rozpuštěné v organickém rozpouštědle (například ether či ethanol) se vstříkují do vodné fáze. Následným odstraněním organického rozpouštědla dochází k formaci liposomů (Pradhan et al.).

### ***Charakterizace***

Charakterizace liposomů zahrnuje průměrnou velikost částic a distribuci velikosti (neboli index polydisperzity), povrchový náboj (neboli Zeta potenciál), tvar, lamelaritu, účinnost enkapsulace, uvolňování léčiva a fázové chování (Bozzuto, Molinari 2015; Mahmood, Mandal, Chatterjee 2016).

V současnosti nejvyžívanějším nástrojem pro **měření velikosti** a polydisperzity liposomů je technika dynamického rozptylu světla (z angl. dynamic light scattering; DLS). DLS je označován jako hydrodynamická technika, protože přímo měří hydrodynamické kvantitativní hodnoty rotačních a translačních difuzních koeficientů, které odpovídají tvaru a velikosti částic na základě teoretických vztahů. Měření velikosti částic je založeno na náhodných změnách intenzity rozptylu světla suspenze. Velikost částic lze měřit také metodami mikroskopickými (Mahmood, Mandal, Chatterjee 2016).

Co se týče **indexu polydisperzity (PDI)**, je populace NPs v dané formulaci vždy polydisperzní, a proto jsou výsledky měření DLS prezentovány z hlediska homogenity a heterogenity distribuce velikostí částic. PDI získaný pomocí DLS je bezrozměrná veličina, která udává šířku velikostní distribuce na základě kumulantní analýzy. Nízká hodnota PDI ( $<0,1$ ) signalizuje homogenní populaci částic, zatímco hodnota vyšší než 0,3 naznačuje výrazně heterogenní rozložení velikostí. Pro dosažení požadované velikosti NPs se používají různé přístupy, protože velikost částic ovlivňuje účinnost systému pro cílenou distribuci léčiv (Mahmood, Mandal, Chatterjee 2016).

DLS umožňuje také měření hodnot **zeta potenciálu**, který informuje o elektrostatickém stavu částic v kapalném prostředí. Tento parametr určuje elektroforetickou pohyblivost částic suspendovaných v koloidu. Metoda spočívá v průchodu laserového paprsku vzorkem, přičemž se měří rychlost částic pohybujících se v aplikovaném elektrickém poli. Elektrický náboj na hranici dvojvrstvy se označuje jako zeta potenciál. Pohyb částic je výsledkem Brownova pohybu a přitažlivých/odpudivých sil mezi nimi pod vlivem aplikovaného elektrického pole. Pokud odpudivé síly převažují nad přitažlivými, formulace je stabilnější. Zeta potenciál s hodnotami nad +25 mV nebo pod -25 mV značí vyšší stabilitu, protože v tomto rozmezí je zabráněno aglomeraci částic a ty tak zůstávají v dispergovaném stavu po delší dobu (Mahmood, Mandal, Chatterjee, nedatováno).

## 6 Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit liposomální nanočástice metodou tenkého filmu a navrhnout takový postup přípravy, aby částice splňovaly granulometrické parametry vhodné pro *in vitro* a *in vivo* aplikaci. To obnášelo zjistit a standardizovat procesní parametry, jako použitá rozpouštědla, lipidy, jejich množství a koncentrace. Cílem bylo získat částice s ideální velikostí, pod 200 nm, a co nejnižším indexem polydisperzity.

Tyto nanočástice měly za cíl sloužit jako nosiče léčiv pro zvýšení biodostupnosti antibiotik v infikovaných makrofázích. Jako modelové léčivo byl vybrán gentamicin, představující léčivo s problematickou intracelulární biodostupností. Hodnocenými charakteristikami těchto nanočástic byla velikost a polydisperzita.

## **7 Experimentální část**

### **7.1 Použité suroviny**

- fosfatidylcholin (PCh), Merck (Praha, ČR)
- cholesterol, Merck (Praha, ČR)
- chloroform (CCl<sub>3</sub>), PENTA, s.r.o (Chrudim, ČR)
- metanol (MeOH), PENTA, s.r.o (Chrudim, ČR)
- čištěná voda, příprava na FaF UK
- gentamicin sulfát (GENT), Fagron, a.s.
- PBS tablety, Merck (Praha, ČR)
- trehalosa, Merck (Praha, ČR)

### **7.2 Použité přístroje**

- analytické váhy Ohaus discovery (Ohaus, Greifensee, Švajčiarsko), max. 210 g d= 0,1mg
- váhy Kren 440-53N (Kren, Balingen, Německo), max. 400g, d=0,01g
- pipety Finnpiette F2, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- rotační vakuová odparka IKA RV 10 (IKA C-MAG HS, Ika Werke, Staufen im Beisgau, Německo)
- ultrazvuková čistička Sonorex Super 10 P, Bandelin (Berlín, Německo)
- magnetická míchačka s ohřevem (IKA C-MAG HS, Ika Werke, Staufen im Beisgau, Německo)
- Zetasizer Nano series (Nano-ZS), Malvern Panalytical (Malvern, Spojené království)
- Multifunkční chlazená centrifuga MPW 260R, MPW Medical Instruments (Varšava, Polsko)
- Třepačka Multi-Vortex V-32 (Biosan, Riga, Lotyšsko)

### **7.3 Použité metody**

V průběhu experimentální práce bylo připraveno 16 vzorků liposomálních NPs metodou tenkého filmu. Z těchto 16 vzorků byly následně vybrány dva vzorky a z nich připraveny liposomy obsahující enkapsulovaný roztok účinné látky GENT. Všechny vzorky byly podrobeny charakterizaci měřením velikosti NPs a PDI.

#### **7.3.1 Příprava nanočástic**

K přípravě nanočástic byla využita metoda tenkého filmu, tvořeného fosfatidylcholinem (PCh) nebo směsí PCh a cholesterolu v různých poměrech (1:9, 3:7, 1:1).

Pro vzorky 1-3 bylo nejdříve na analytických vahách naváženo 100 mg PCh, toto množství bylo následně rozpuštěno pomocí 12,5 ml methanolu (MeOH) (viz tabulka 1).

V případě vzorků 4-6 se navážky pohybovaly mezi 20-100 mg PCh, jako rozpouštědlo bylo použito 2,5 nebo 7,5 ml směsi MeOH a  $CCl_3$  v poměru 1:1 (viz tabulka 2).

Vzorky 7-9 byly tvořeny 20-100 mg PCh, který byl rozpuštěn 2,5-12,5 ml směsi MeOH a  $CCl_3$  v poměru 1:10 (viz tabulka 3).

Pro vzorky 10-13 bylo naváženo 20-100 mg PCh, jako rozpouštědlo posloužilo 2,5-12,5 ml směsi MeOH a  $CCl_3$  v poměru 3:7 (viz tabulka 4).

U vzorků 14-16 byl lipidový film tvořen směsí PCh a cholesterolu v poměrech 1:1, 3:7 a 1:9. Jako organické rozpouštědlo posloužilo u těchto vzorků 7,5 ml směsi MeOH a  $CCl_3$  v poměru 3:7 (viz tabulka 5).

Roztok lipidů byl následně kvantitativně přenesen do baňky s kulatým dnem o objemu 50 ml a odpařen na vakuové odparce za teploty vodní lázně vyšší než fázový přechod lipidů (více než 70 °C). Poté, co na dně baňky vznikl tenký lipidový film, byla baňka připojena pod zdroj vysokého vakua za účelem odstranění reziduí organického rozpouštědla.

Takto připravený film byl následně rehydratován přidáním 3–10 ml čisté vody. Rehydratace probíhala pomocí magnetického míchadla v průběhu 1 hodiny, dokud nebyl lipidový film viditelně uvolněn ze dna baňky.

Z procesu přípravy vzorků 15 a 16 vychází postupy přípravy pro vzorky 17 až 19, které se liší použitým rehydratačním médiem, jelikož vzorky 17 až 19 obsahují enkapsulovaný roztok GENT.

Pro vzorky 17 a 18, vycházející ze vzorku 15, bylo naváženo 35 mg PCh a 15 mg cholesterolu. Pro vzorek 19, který vycházel ze vzorku 16, činila navážka PCh 45 mg a navážka cholesterolu 5 mg.

Lipidy byly ve všech případech rozpuštěny v 7,5 ml organického rozpouštědla, směsi MeOH a CCl<sub>3</sub> v poměru 3:7. Po odpaření rozpouštědla a vzniku tenkého lipidového filmu podle postupu uvedeného výše, byl tento film rehydratován. U vzorku 17 byl lipidový film rehydratován 5 ml roztoku GENT v čisté vodě o koncentraci 0,8 mg/ml. Vzorky 18 a 19 byly rehydratovány 5 ml roztoku GENT ve fosfátovém pufru o koncentraci 0,8 mg/ml.

Baňka obsahující tento rozrušený lipidový film byla následně umístěna do ultrazvukové vodní lázně, zahřáté na 70 °C. Působením ultrazvuku docházelo k dalšímu rozrušování lipidových shluků na MLVs a ULVs.

Všechny šarže byla následně dále zpracovány tak, aby bylo umožněno jejich zmrazení a uchování k případné pozdější charakterizaci.

*Tabulka 1: složení vzorků, u kterých byl jako rozpouštědlo použitý MeOH*

vzorek	navážka PCh (mg)	množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)
<b>1</b>	100	12,5	3
<b>2</b>			5
<b>3</b>			10

Tabulka 2: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 1:1

vzorek	navážka PCh (mg)	množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)
<b>4</b>	20	2,5	5
<b>5</b>	50	7,5	
<b>6</b>	100	7,5	

Tabulka 3: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 1:10

vzorek	navážka PCh (mg)	množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)
<b>7</b>	20	2,5	5
<b>8</b>	50	7,5	
<b>9</b>	100	12,5	

Tabulka 4: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 3:7

vzorek	navážka PCh (mg)	množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)
<b>10</b>	20	2,5	5
<b>11</b>	30	4,5	
<b>12</b>	50	7,5	
<b>13</b>	100	12,5	

Tabulka 5: složení vzorků s přidavkem cholesterolu, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 3:7

vzorek	navážka PCh (mg)	Navážka cholesterolu (mg)	Množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)
<b>14</b>	25	25	7,5	5
<b>15</b>	35	15		
<b>16</b>	45	5		

Tabulka 6: složení vzorků s enkapsulovaným roztokem GENT

vzorek	navážka PCh (mg)	navážka cholesterolu (mg)	množství rozpouštědla (ml)	rehydratace (ml)	rehydratační médium
17	35	15	7,5	5	roztok GENT v čišťené vodě (0,8 mg/ml)
18	35	15			roztok GENT ve fosfátovém pufru (0,8 mg/ml)
19	45	5			roztok GENT ve fosfátovém pufru (0,8 mg/ml)

### 7.3.2 Charakterizace částic

V průběhu sonikace byly odebírány vzorky o objemu 200  $\mu$ l, určené k měření velikosti částic a PDI. K tomuto měření byl využit přístroj Zetasizer Nano ZS. Odebrané vzorky byly pipetovány do mikrokvyvety a zředěny pomocí 1 ml čišťené vody. Kvyveta byla následně umístěna do přístroje. Intenzita rozptýleného světla byla detekována v úhlu zpětného rozptylu 173°. Na základě protokolu distribuce velikosti dle intenzity rozptýleného světla byly vypočtena velikost a PDI částic. Refraktivní index a absorpce byly nastaveny pro liposomy z továrního nastavení přístroje. Viskozita média byla nastavena jako viskozita čišťené vody. Všechny vzorky byly měřeny třikrát a každé měření zahrnovalo 12 až 15 nezávislých běhů.

### 7.3.3 Další zpracování nanočástic

Surové liposomy byly následně separovány z čišťené vody/roztoku GENT pomocí centrifugy. Do 4 zkumavek Eppendorf byl napipetován vždy 1 ml suspenze liposomů, které byly následně centrifugovány po dobu 15 minut při rychlosti 10 000 otáček za minutu. Po odstředění byl z každé zkumavky pomocí pipety odebrán supernatant. Sedimentované částice ve zkumavce byly znovu rozdispergovány do objemu 1 ml pomocí čišťené vody a podrobeny druhému cyklu centrifugace. Následně byl opět odstraněn supernatant a vzniklý sediment byl tentokrát

rozdispergován do původního objemu 1 ml pomocí 5% roztoku trehalosy, sloužící jako kryoprotektivum, a umístěn do -20 °C.

## 8 Výsledky

Tato kapitola prezentuje výsledky získané při přípravě liposomů. Cílem bylo připravit liposomy a dosáhnout u nich optimální velikosti pod 200 nm a co nejnižší PDI.

Sledovanými parametry v průběhu přípravy liposomů byly množství a složení lipidické formulace, množství čištěné vody použité k rehydrataci lipidového filmu, složení organické fáze využité k rozpuštění lipidů, a také čas, po který probíhala jeho sonikace.

Tabulky 7 a 8 shrnují hodnoty naměřené u jednotlivých vzorků.

Tabulka 7: hodnoty naměřené u vzorků 1 až 16

vzorek	čas měření	Ø velikost částic (nm)	SD	Ø PDI	SD
1	10	836,0	7,4	0,65	0,11
	30	914,3	83,2	0,61	0,21
	60	859,1	71,1	0,64	0,13
2	60	59,9	0,6	0,32	0,01
3	60	36,3	0,7	0,23	0,01
4	30	35,5	0,5	0,31	0,03
	60	28,0	0,1	0,22	0,01
5	30	70,0	0,1	0,24	0,01
	60	48,6	0,5	0,27	0,01
6	30	57,8	0,1	0,27	0,00
	60	48,7	0,1	0,27	0,00
7	30	56,0	0,3	0,45	0,01
	60	49,8	1,0	0,48	0,02
8	30	74,0	0,4	0,37	0,00
	60	68,0	0,3	0,43	0,02
9	30	47,4	0,3	0,41	0,00
	60	45,8	0,3	0,42	0,01
10	30	37,6	2,9	0,21	0,07
	60	33,9	0,1	0,29	0,02
11	5	197,6	6,0	0,48	0,04
	7	169,7	2,5	0,46	0,03
	10	146,6	1,9	0,42	0,01
	15	127,0	1,7	0,41	0,02
	20	111,6	1,0	0,36	0,05
12	30	32,4	0,1	0,21	0,01
	60	30,2	0,4	0,17	0,00
13	30	50,7	0,6	0,37	0,01
	60	31,3	0,2	0,20	0,01
14	5	528,8	1,5	0,57	0,01
	7	372,2	0,4	0,49	0,04
	10	360,3	4,1	0,73	0,02
	15	359,6	4,6	0,47	0,03
	20	578,4	21,6	0,59	0,06
15	5	173,8	0,5	0,46	0,01
	7	141,8	0,4	0,39	0,01
	10	124,3	1,6	0,34	0,02
	15	109,4	0,3	0,26	0,01
	20	100,1	0,7	0,24	0,00
16	5	325,8	16,5	0,66	0,17
	7	298,0	3,8	0,86	0,00
	10	248,7	3,6	0,54	0,02
	15	203,4	1,0	0,46	0,03
	20	171,4	2,6	0,48	0,02

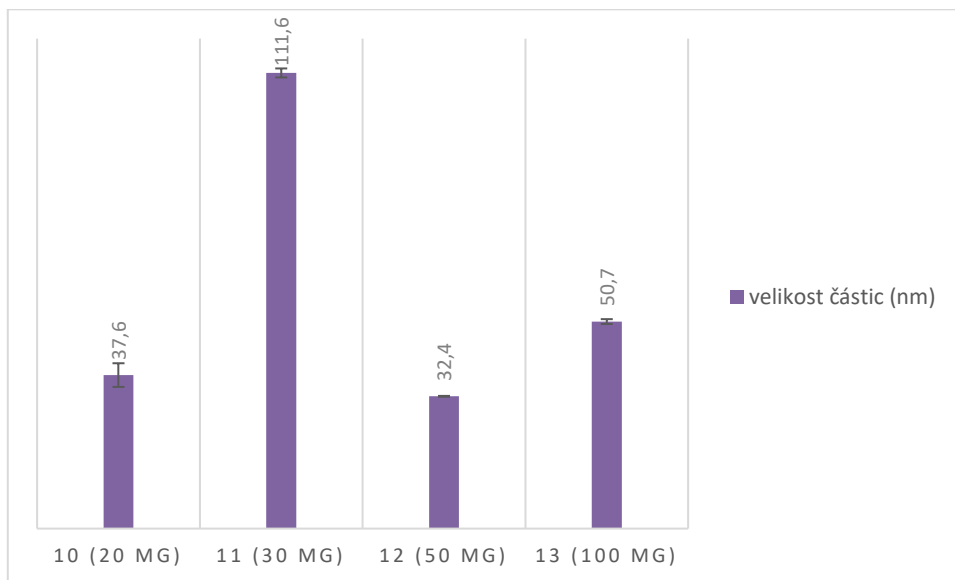
Tabulka 8: hodnoty naměřené u vzorků 17 až 19, obsahujících enkapsulovaný GENT

vzorek	čas měření	Ø velikost částic [nm]	SD	Ø PDI	SD
<b>17</b>	7	1049,7	58,5	0,86	0,04
	10	2393,7	225,4	0,68	0,28
	15	964,7	139,2	1,00	0,00
<b>18</b>	7	175,4	4,3	0,47	0,00
	10	146,9	0,6	0,42	0,01
<b>19</b>	7	132,1	1,3	0,29	0,01

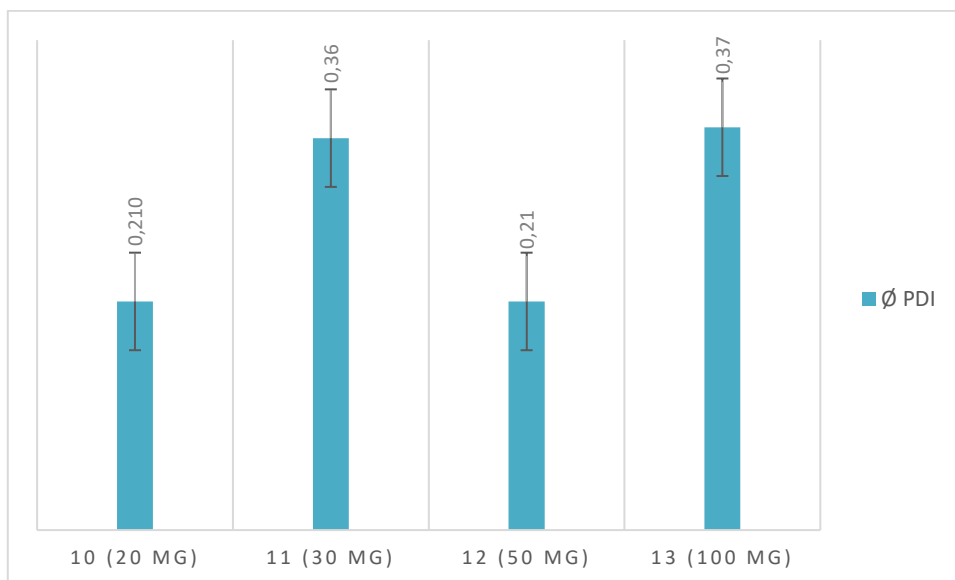
V rámci práce vznikly liposomy v rozmezí velikostí 28 až 2393,7 nm. Polydisperzita připravených liposomů se pohybovala od hodnoty 0,165 až do hodnoty 1. Faktory ovlivňující široké rozmezí získaných hodnot jsou popsány a diskutovány v dalších kapitolách.

## 8.1 Vliv lipidické formulace

Obrázky 5 a 6 graficky znázorňují vliv navážky PCh na velikost a PDI vzniklých liposomů. Shrnují hodnoty naměřené u vzorků 10, 11, 12 a 13.



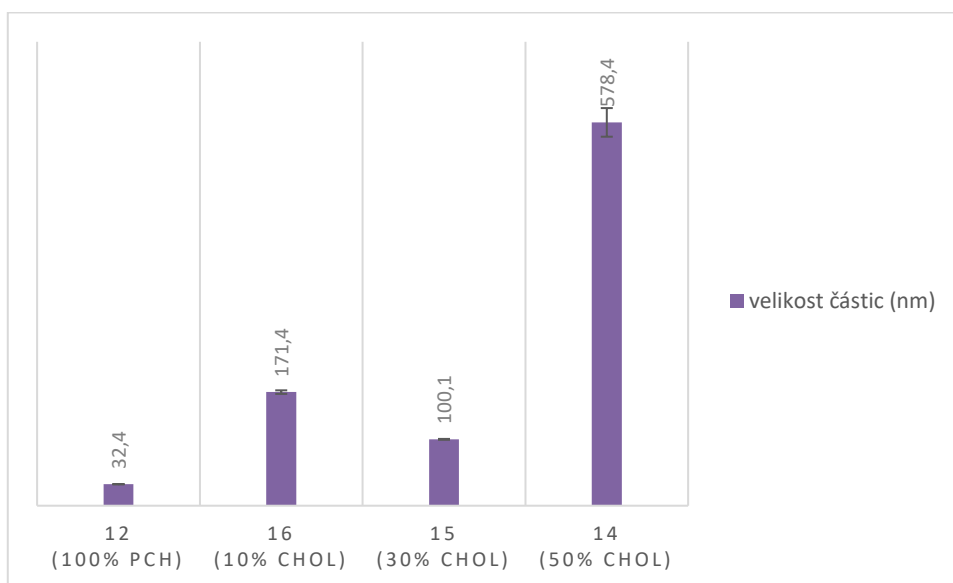
Obrázek 9: Graf znázorňující vliv navážky PCh na velikost částic



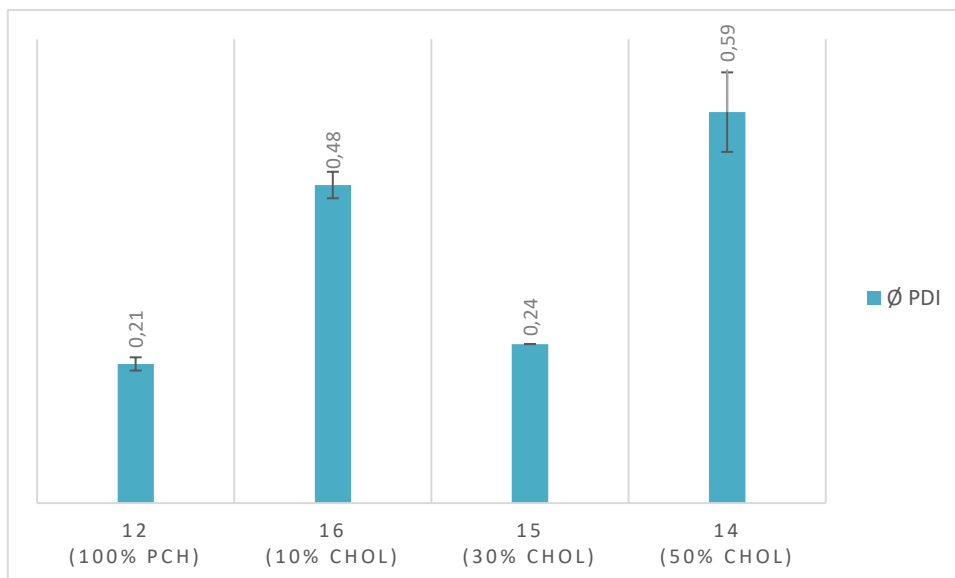
Obrázek 10: Graf znázorňující vliv navážky PCh na PDI částic

Hodnoceny byly vzorky připravené s navážkou 20, 30, 50 a 100 mg PCh. Všechny vzorky byly připravovány za použití baňky o stejném objemu (50 ml) a konstantního

poměru rehydratačního média, a to 1,25 ml čišťené vody na 10 mg navážky PCh. Vzorky byly měřeny po 30 minutách sonikace vysokoamplitudovým ultrazvukem. Výsledky ukázaly značné rozdíly v naměřených hodnotách velikosti i PDI v závislosti na navážce lipidů. Vzorek s navážkou 20 mg vykazoval průměrnou velikost částic 37,6 nm a PDI 0,21. Při zvýšení navážky na 30 mg došlo k výraznému nárůstu velikosti na 111,6 nm a současně ke zvýšení PDI na 0,36. Naopak při navážce 50 mg byla zaznamenána nejnižší průměrná velikost částic (32,4 nm) a velmi nízké PDI 0,21. Vzorek s nejvyšší navážkou (100 mg) dosáhl velikosti 50,7 nm a PDI 0,37, což opět indikuje vyšší míru polydisperzity. Obrázky 7 a 8 prezentují vliv složení lipidické formulace na velikost a PDI připravených částic. Shrnují hodnoty naměřené u vzorků 12, 14, 15 a 16, které se lišily přítomností a obsahem cholesterolu. Hodnoty byly získány po 20 minutách sonikace vzorků.



Obrázek 11: Graf znázorňující vliv složení lipidické formulace na velikost částic

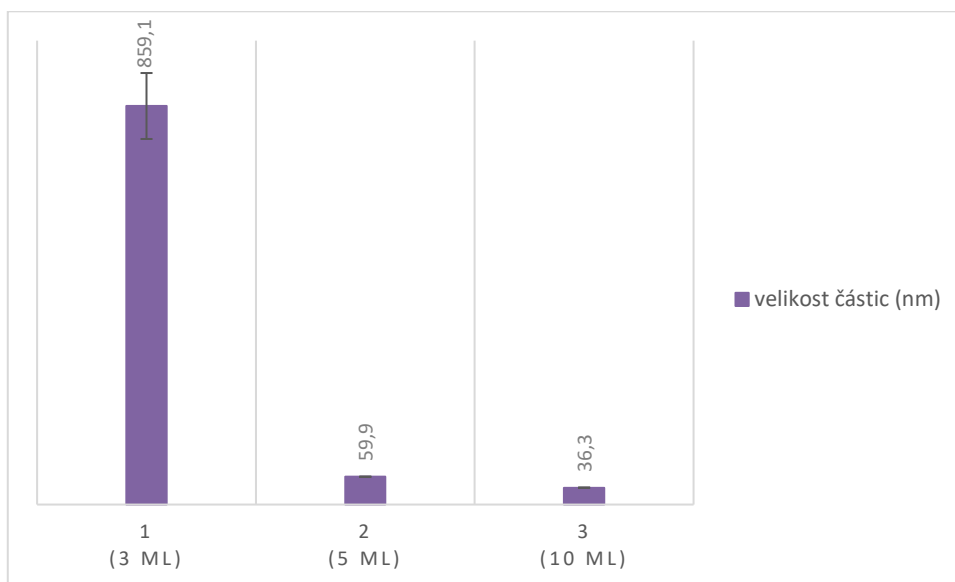


Obrázek 12: Graf znázorňující vliv složení lipidické formulace na PDI částic

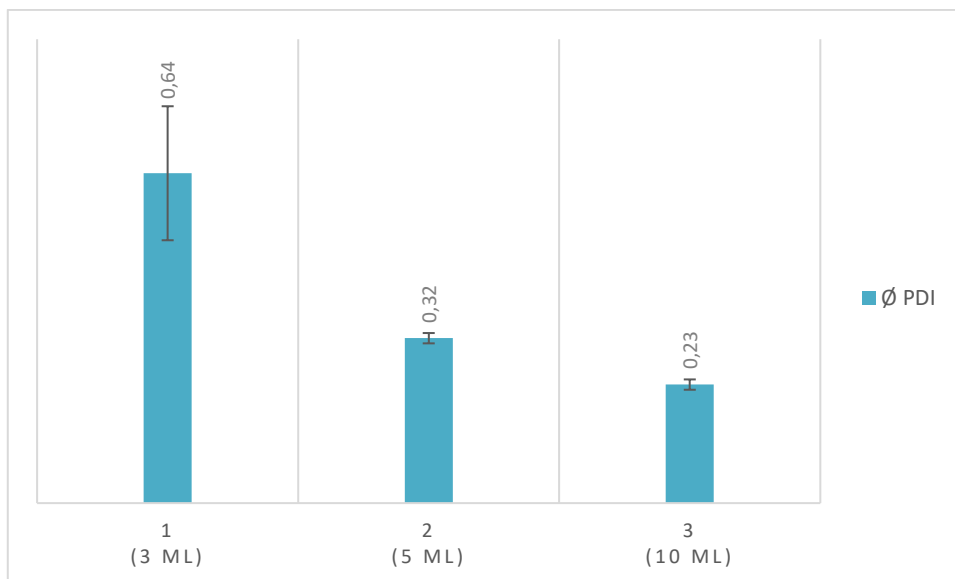
Vzorek složený pouze z PCh vykazoval nejnižší průměrnou velikost částic (32,4 nm) a velmi nízký PDI (0,21). Přídavek cholesterolu ve výši 10 % vedl k výraznému nárůstu velikosti částic na 171,4 nm a současně ke zvýšení PDI na hodnotu 0,48. Při navýšení obsahu cholesterolu na 30 % došlo ke snížení velikosti částic na 100,1 nm a k poklesu PDI (0,24). Nejvyšší podíl cholesterolu (50 %) vedl k výraznému zhoršení obou parametrů – velikost částic vzrostla na 578,4 nm a PDI dosáhlo hodnoty 0,59.

## 8.2 Rehydratace

Obrázek 9 a 10 ukazují vliv množství čištěné vody použité k rehydrataci lipidového filmu na velikost a PDI liposomů.



Obrázek 13: Graf znázorňující vliv množství čištěné vody k rehydrataci na velikost částic



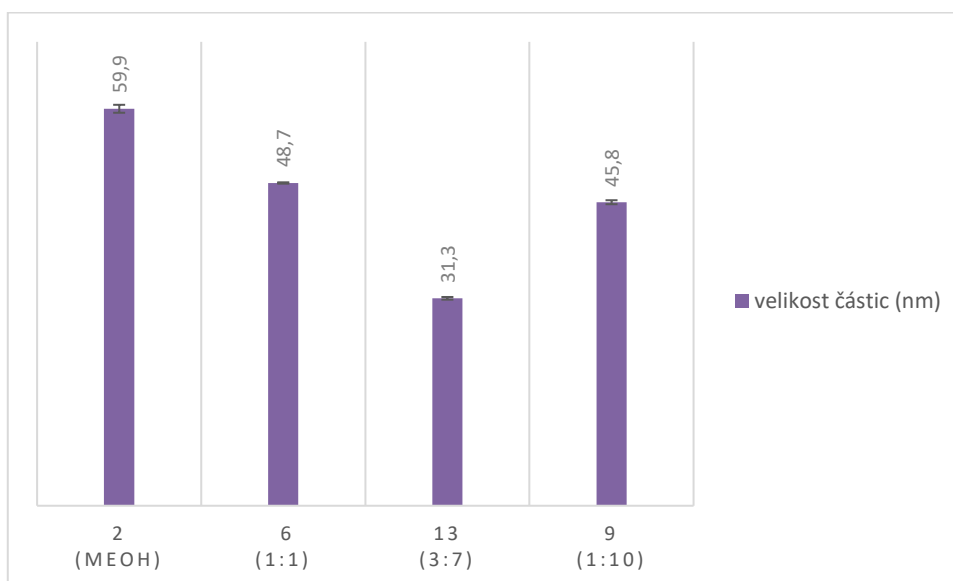
Obrázek 14: Graf znázorňující vliv množství čištěné vody k rehydrataci na PDI částic

V rámci diplomové práce byly testovány tři různé objemy: 3 ml, 5 ml a 10 ml čištěné vody na konstantní množství lipidů (100 mg). Všechny vzorky byly měřeny po 60 minutách sonikace vysokoamplitudovým ultrazvukem.

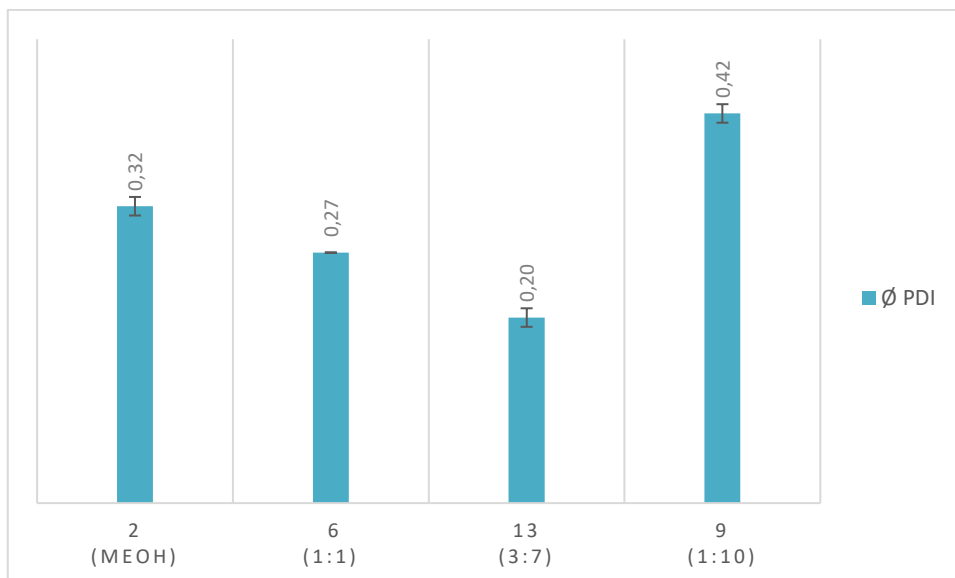
Nejnižší objem, 3 ml, vedl k tvorbě velmi velkých částic o průměrné velikosti 859,1 nm a PDI 0,64. Při navýšení objemu čištěné vody na 5 ml došlo ke značnému zlepšení vlastností liposomů – velikost liposomů klesla na 59,9 nm a PDI na 0,32. Nejlepší výsledky z hlediska polydisperzity byly dosaženy při použití 10 ml čištěné vody, kdy byla naměřena průměrná velikost 36,3 nm a nízké PDI 0,23.

### 8.3 Složení organické fáze

Obrázky 11 a 12 shrnují vliv složení organické fáze na velikost a PDI připravených liposomů. Obrázek vychází z hodnot naměřených pro vzorky 2, 6, 9 a 13, které se lišily přítomností a množstvím  $\text{CCl}_3$ , který tvořil rozpouštědlo spolu s MeOH. Hodnoty byly naměřeny po 60 minutách sonikace vysokoamplitudovým ultrazvukem.



Obrázek 15: Graf znázorňující vliv složení organické fáze na velikost částic



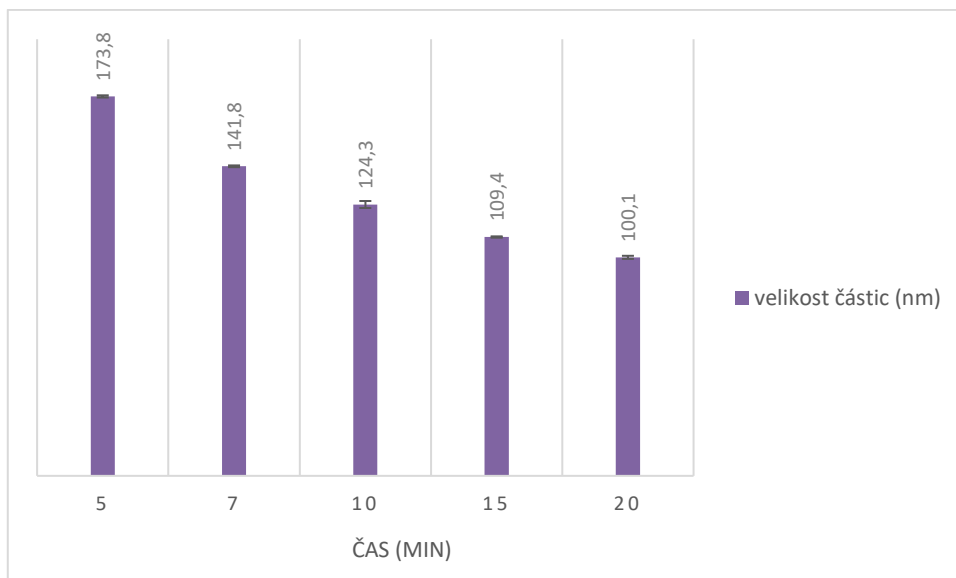
Obrázek 16: Graf znázorňující vliv složení organické fáze na PDI částic

Při přípravě lipidového filmu hraje zásadní roli složení organické fáze, ve které jsou lipidy před odpařením rozpuštěny. V této práci byly hodnoceny čtyři typy použitého rozpouštědla: MeOH, a dále směsi MeOH s  $\text{CCl}_3$  v poměrech 1:1, 3:7 a 1:10.

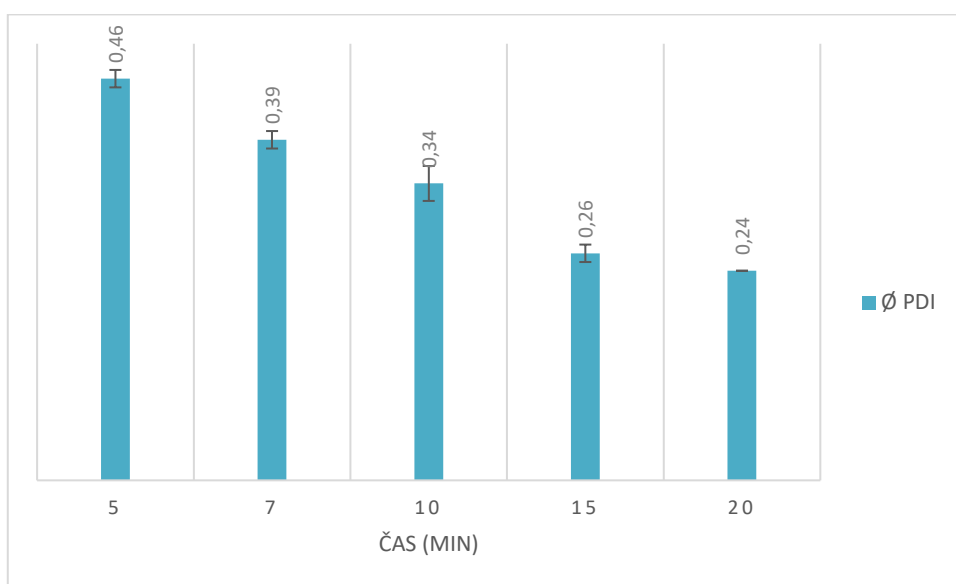
Vzorek připravený v čistém methanolu vykazoval velikost 59,9 nm a PDI 0,32. Přejdem ke směsi MeOH: $\text{CCl}_3$  1:1 došlo ke zmenšení částic na 48,7 nm a ke snížení PDI na 0,27. Nejmenší a nejméně polydisperzní liposomy byly získány při poměru 3:7, s velikostí 31,3 nm a PDI 0,20. Při dalším zvýšení podílu  $\text{CCl}_3$  na 1:10 však velikost vzrostla na 45,8 nm a PDI na 0,42.

#### 8.4 Doba sonikace

Obrázek 13 a 14 graficky zpracovává změnu hodnot velikosti a PDI částic v průběhu sonikace vysokoamplitudovým ultrazvukem u vzorku 15.



Obrázek 17: Graf znázorňující velikost částic v průběhu sonikace



Obrázek 18: Graf znázorňující PDI částic v průběhu sonikace

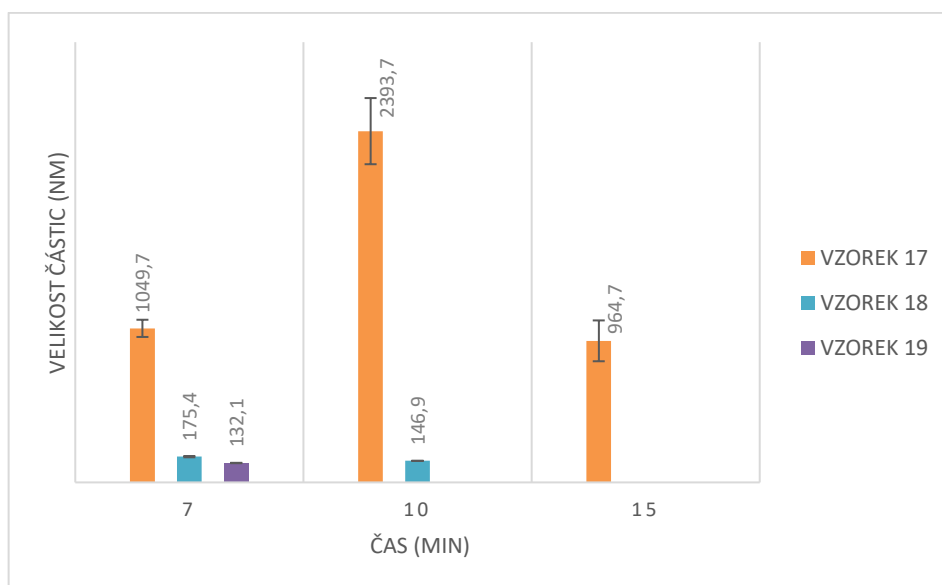
V závěrečné části práce byl hodnocen vliv délky sonikace na velikost a PDI liposomů. Vzorek 15 byl analyzován po 5, 7, 10, 15 a 20 minutách sonikace.

Po 5 minutách činila průměrná velikost liposomů 173,8 nm a PDI dosahovalo hodnoty 0,46. S prodlužujícím se časem sonikace docházelo ke kontinuálnímu poklesu velikosti i PDI – po 10 minutách byla velikost 124,3 nm (PDI 0,34)

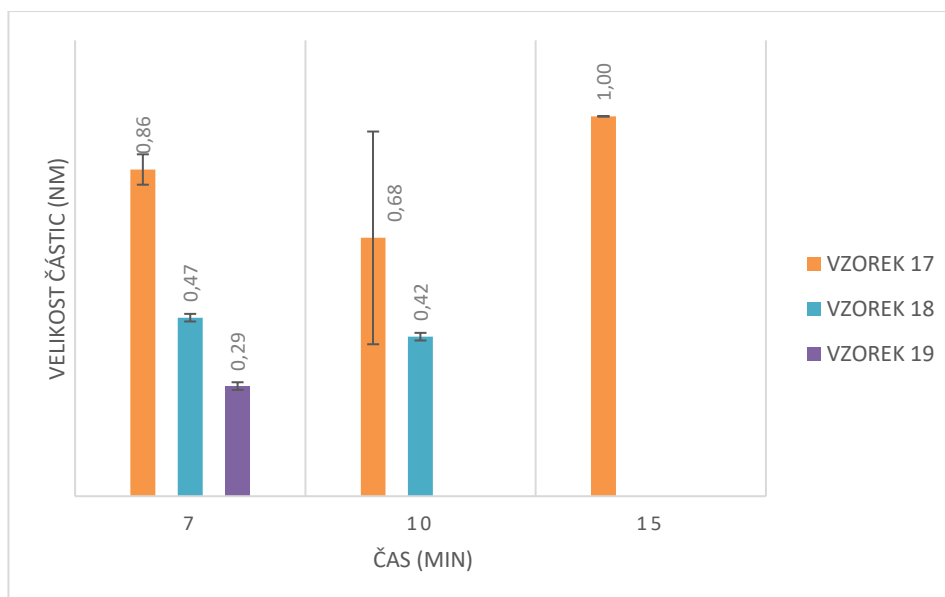
a po 15 minutách již 109,4 nm (PDI 0,26). Nejlepších hodnot bylo dosaženo po 20 minutách sonikace, kdy velikost klesla na 100,1 nm a PDI na 0,24.

### 8.5 Velikost částic a index polydisperzity vzorků obsahujících gentamicin

Obrázky 15 a 16 graficky znázorňují hodnoty získané měřením vzorků 17, 18 a 19 v různých časech sonikace.



Obrázek 19: Graf znázorňující velikost částic u vzorků obsahujících GENT v různých časech sonikace



Obrázek 20: Graf znázorňující PDI částic u vzorků obsahujících GENT v různých časech sonikace

Měřeny byly tři vzorky s enkapsulovým léčivem: vzorek 17 s GENT rozpuštěným v čištěné vodě, vzorek 18 s GENT rozpuštěným ve fosfátovém pufru a vzorek 19, který obsahoval rovněž roztok GENT ve fosfátovém pufru, ale od vzorku 18 se lišil složením lipidické formulace (viz tabulka 6).

Vzorek 17 vykazoval nejvyšší průměrné velikosti částic a velmi vysoké hodnoty PDI, svědčící o výrazné heterogenitě a nestabilitě systému. Po 7 minutách sonikace dosahovala velikost 1049,7 nm (PDI 0,86), po 10 minutách došlo dokonce ke vzniku velkých agregátů s průměrnou velikostí 2393,7 nm (PDI 0,68). Po 15 minutách došlo sice ke zmenšení velikosti na 964,7 nm, avšak hodnota PDI vzrostla až na 1, což signalizuje extrémní polydisperzitu a nesoudržnost systému. Při takto vysokých hodnotách nemůžeme považovat měření přístrojem Zetasizer Nano ZS za směrodatné.

Oproti tomu vzorek 18 vykazoval výrazně lepší výsledky. Po 7 minutách byla naměřena velikost 175,4 nm a PDI 0,47. Po 10 minutách došlo k dalšímu zmenšení na 146,9 nm a PDI kleslo na 0,42.

Optimální hodnoty byly dosaženy u vzorku 19, který vykazoval velikost 132,1 nm a PDI 0,29 již po 7 minutách sonikace.

## 9 Diskuse

Cílem této práce bylo optimalizovat přípravu liposomů metodou tenkého filmu a identifikovat klíčové faktory ovlivňující jejich velikost a PDI. V rámci experimentální práce byly hodnoceny různé proměnné – množství lipidů, složení lipidické formulace, objem rehydratačního média, typ organického rozpouštědla, doba sonikace i vliv enkapsulace modelového léčiva GENT. Výsledky přinesly poznatky týkající se vztahu mezi procesem přípravy a výslednou kvalitou liposomů.

Prvním zkoumaným parametrem byl vliv navážky lipidů použitých pro tvorbu lipidového filmu. Byly testovány navážky 20, 30, 50 a 100 mg PCh na dně baňky o objemu 50 ml.

Výsledky ukázaly nelineární závislost mezi naváženým množstvím a velikostí či polydisperzitou liposomů. Největší částice byly pozorovány při navážce 30 mg zatímco nejmenší a nejhomogennější částice vznikly při 50 mg. Výkyv hodnot u vzorku o navážce 30 mg lze vysvětlit možným nerovnoměrným rozložením lipidů při odpařování, či nevhodnou tloušťkou filmu pro daný objem baňky. Při nejvyšší navážce (100 mg) byly sice liposomy stále relativně malé, ale PDI ukazoval na vyšší heterogenitu, což pravděpodobně ukazuje na jejich agregaci vlivem vysoké koncentrace liposomů ve vzorku.

Z výsledků vyplývá, že tloušťka lipidového filmu, která přímo souvisí s množstvím lipidů, ovlivňuje efektivitu rehydratace. Při příliš malé nebo naopak příliš vysoké navážce může být film nerovnoměrný, což komplikuje jeho rozrušení a rovnoměrné samouspořádání lipidů při hydrataci. Ideální množství lipidů by mělo umožnit vytvoření tenkého, souvislého filmu, který se snadno disperguje a vytváří malé a homogenní liposomy. Vhodným kompromisem mezi navážkou lipidů a kvalitou částic se ukázala být navážka 50 mg PCh.

Přídavek cholesterolu do lipidické formulace měl zásadní vliv na PDI a velikost liposomů. Cholesterol je běžně využívanou složkou liposomálních formulací pro zvýšení mechanické stability a snížení propustnosti lipidové dvojvrstvy. V rámci této práce byl zkoumán vliv různého poměru cholesterolu ve směsi s PCh, konkrétně byly testovány přídavky 10, 30 a 50 %.

Zatímco čistý PCh vedl k tvorbě malých a homogenních částic, již 10% přídavek cholesterolu vedl ke zdatelnému zvětšení velikosti a širšímu rozptylu velikostí.

Při 30% přídavku došlo ke zlepšení sledovaných parametrů (snížení velikosti i pokles PDI liposomů), ale 50% obsah cholesterolu vedl k výrazné destabilizaci systému s tvorbou velmi velkých částic a s vyšší hodnotou PDI. Bylo tedy zjištěno, že s rostoucím podílem cholesterolu až do celkového 50% zastoupení ve formulaci docházelo k výraznému zvětšení velikosti částic a současně ke zvýšení PDI. Výsledky vzorků s přídavkem cholesterolu jsou v souladu se studií Briuglia a kol., jejichž práce dokládá, že poměr 2:1 (tj. 70 % lipidů a 30 % cholesterolu) představuje vhodný poměr z hlediska vlastností a stability liposomální formulace (Briuglia et al. 2015).

Tento jev lze vysvětlit zvýšenou rigiditou lipidové dvojvrstvy při vyšším obsahu cholesterolu, která může bránit správnému samouspořádání lipidů během rehydratace lipidového filmu. Výsledkem jsou méně stabilní a méně homogenní částice, často o větších rozměrech. Vysoký obsah cholesterolu může kvůli zvýšené rigiditě lipidové membrány také podporovat tvorbu multilamelárních nebo agregovaných struktur. Výsledky naznačují, že při použití metody tenkého filmu je vhodné pečlivě optimalizovat množství cholesterolu, neboť jeho nadměrné množství může negativně ovlivnit požadované vlastnosti vzniklých liposomů.

Dalším sledovaným parametrem bylo množství vody použité k rehydrataci lipidového filmu. Testované objemy 3 ml, 5 ml a 10 ml prokázaly výrazný vliv na výsledné velikosti liposomů.

Nejmenší a nejhomogennější částice vznikly při použití 10 ml vody, zatímco při použití pouhých 3 ml dosáhla velikost částic až 859 nm s PDI 0,64.

Malý objem rehydratačního média neumožňuje dostatečné a rovnoměrné proniknutí do všech vrstev lipidového filmu, což může vést ke vzniku MLVs nebo agregátů. Naopak vyšší množství vody podporuje úplnou rehydrataci filmu a tím i správné samouspořádání lipidových molekul do unilamelárních liposomů. Výsledky potvrzují, že dostatečný objem vody je nezbytný pro efektivní dispergaci a dosažení žádaných vlastností liposomů.

Jedním z klíčových faktorů ovlivňujících vlastnosti připravovaných liposomů je složení organického rozpouštědla použitého při tvorbě lipidového filmu. V rámci této

práce byly testovány čtyři různé varianty organické fáze: čistý MeOH a směsi MeOH s CCl<sub>3</sub> v poměrech 1:1, 3:7 a 1:10.

Výsledky ukázaly, že čistý MeOH (polární rozpouštědlo), vedl k tvorbě liposomů o velikosti 60 nm a PDI 0,31, což značí střední disperzitu částic. Při přidavku CCl<sub>3</sub> (nepolární rozpouštědlo) a použití směsi MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 1:1 došlo k mírnému zlepšení parametrů, což naznačuje, že částečné snížení polaroty rozpouštědla přispívá k lepšímu rozpuštění lipidových složek a rovnoměrnější tvorbě filmu. Optimálních výsledků bylo dosaženo při poměru 3:7 MeOH:CCl<sub>3</sub>, kde byla pozorována nejmenší velikost částic a zároveň nejnižší hodnota PDI. Naopak při použití výrazně nepolární směsi 1:10 MeOH:CCl<sub>3</sub> došlo ke zvýšení PDI na hodnotu 0,42, přestože velikost částic zůstala relativně malá. Tento výsledek může souviset s nerovnoměrnou tvorbou lipidového filmu nebo sníženou rozpustností fosfolipidů s polárními hlavicemi ve velmi nepolárním prostředí.

Z výsledků vyplývá, že polarita organického rozpouštědla výrazně ovlivňuje proces tvorby lipidového filmu i následné samouspořádání lipidů během rehydratace. Směsi s ekvivalentním nebo mírně vyšším přidavkem CCl<sub>3</sub> k MeOH umožňují rovnoměrnější rozprostření lipidů na povrchu baňky a po odpaření vedou k tvorbě tenkých, dobře hydratovatelných filmů. Směs MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 3:7 se jeví jako optimální složení organické fáze pro přípravu liposomů metodou tenkého filmu, což dokládá i přehledový článek Šturm a Poklar Ulrich, který tento poměr rovněž zmiňuje jako vhodný (Šturm, Poklar Ulrich 2021).

Z pohledu redukce velikosti částic se potvrdilo, že sonikace představuje účinný nástroj k úpravě velikosti a PDI liposomů. S prodlužující se dobou sonikace docházelo k výraznému zmenšování velikosti liposomů a poklesu PDI. Tento efekt je dán postupným mechanickým rozrušováním původních multilamelárních struktur na ULVs, které jsou při delším působení ultrazvuku dále zmenšovány. Ačkoli tato transformace vede ke vzniku menších a stabilnějších částic s nižší polydisperzitou, je třeba upozornit na možné nevýhody příliš dlouhotrvající nebo intenzivní sonikace. V důsledku narušení lipidové dvojvrstvy může docházet k úniku enkapsulovaného léčiva do okolního prostředí, čímž je snižována jeho účinnost. Optimalizace doby

sonikace je proto zásadní pro dosažení kompromisu mezi požadovanými rozměry částic a zachováním vnitřního obsahu liposomů.

V poslední části práce byla připraveny částice s enkapsulovaným GENT. Proces enkapsulace vyžadoval optimalizaci zejména v souvislosti s hydrofilní povahou a chemickými vlastnostmi tohoto léčiva, které ovlivňují efektivitu zapouzdření a interakci s lipidovou matricí. Výsledky ukázaly, že prostředí, ve kterém je GENT před enkapsulací rozpuštěn, má zásadní vliv na výslednou velikost a PDI částic.

Při použití čištěné vody jako rozpouštědla pro GENT docházelo k tvorbě extrémně velkých liposomálních struktur s velmi vysokými hodnotami PDI. Tyto výsledky poukazují na destabilizaci systému a neschopnost vytvořit stabilní liposomy s nízkým PDI. Tento efekt lze přičíst výkyvům pH po rozpuštění GENT v čištěné vodě – jelikož GENT je silná zásada, jeho rozpuštění ve vodě může způsobit výrazné zvýšení pH. Tento výkyv ovlivňuje nejen ionizační stav samotného léčiva, ale i povrchový náboj PCh tvořícího liposomální membránu.

PCh, hlavní komponenta použitých liposomů, nese za fyziologických podmínek současně kladný i záporný náboj (pozitivní náboj na cholinové skupině a negativní na fosfátové). V prostředí s mírně zásaditým pH však může dojít ke změnám v ionizačním stavu fosfátové skupiny, která může ztrácet svůj záporný náboj. To snižuje elektrostatickou rovnováhu v rámci lipidové dvojvrstvy a narušuje interakce mezi lipidy. Výsledkem může být menší kompaktnost, nižší mechanická stabilita a zvýšená tendence ke vzniku nepravidelných nebo fúzujících vezikul, což se odráží ve vyšších hodnotách velikosti a PDI vzorku 17.

Použitím fosfátového pufru se tento problém podařilo významně omezit. Stabilizace pH přispěla k zachování rovnováhy elektrostatických sil a správného ionizačního stavu fosfatidylcholinu, což umožnilo tvorbu stabilnějších liposomů. Výsledné liposomy vzorku 18 měly výrazně menší velikosti i hodnoty PDI. Optimální výsledky pak prokázal vzorek 19, u kterého byly optimalizovány jak podmínky rozpouštění léčiva, tak i další parametry přípravy (přídavek cholesterolu, složení organické fáze, délka sonikace). U vzorku 19 bylo dosaženo velikosti 132,1 nm a

PDI 0,29. Tento výsledek ukazuje potenciál liposomální formulace jako vhodného nosiče pro GENT.

## 10 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací přípravy liposomů metodou tenkého filmu. Cílem bylo identifikovat klíčové faktory, které ovlivňují výslednou velikost a polydisperzitu liposomů, a na základě toho navrhnout efektivní postup přípravy vhodný pro enkapsulaci hydrofilního léčiva GENT.

Výsledky prokázaly, že mezi nejdůležitější parametry přípravy patří zejména správná volba množství lipidů, dostatečný objem rehydratačního média, optimalizované složení organické fáze a kontrolovaná doba sonikace.

Bylo zjištěno, že příliš nízké nebo naopak velmi vysoké množství lipidů může vést ke zvýšené heterogenitě částic. Stejně tak nedostatečný objem rehydratačního média významně zhoršuje vlastnosti vzniklých liposomů. Optimálních výsledků z hlediska cílové velikosti a nízké polydisperzity – bylo dosaženo při použití lipidové navážky 50 mg, rehydrataci pomocí 5 a více ml čištěné vody a při použití směsi organických rozpouštědel MeOH:CCl<sub>3</sub> v poměru 3:7.

Výrazný vliv na výsledné vlastnosti mělo také složení lipidické formulace. Přídavek cholesterolu ovlivnil stabilitu i velikost liposomů, přičemž vysoké koncentrace cholesterolu (50 %) vedly k destabilizaci systému a tvorbě velkých částic s vysokou polydisperzitou. Naopak mírný přídavek (30 %) se ukázal jako vhodný kompromis mezi stabilitou a velikostí částic.

Zásadním výstupem této práce byla optimalizace procesu enkapsulace GENT. Bylo prokázáno, že prostředí, ve kterém je GENT rozpuštěn, hraje klíčovou roli. Zatímco použití čištěné vody vedlo k destabilizaci systému vlivem výkyvu pH, využití fosfátového pufru tento problém odstranilo a vedlo k tvorbě stabilních a homogenních liposomálních částic. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u vzorku 19, který uplatnil optimalizované podmínky pro přípravu roztoku GENT a aplikoval výše zjištěné požadavky na proces přípravy liposomů.

## 11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma jednoduchého unilamelárního liposomu.....	23
Obrázek 2: struktura cholesterolu .....	24
Obrázek 3: struktura PCh.....	25
Obrázek 4: Schéma přípravy liposomů metodou tenkého filmu. ....	28
Obrázek 5: Graf znázorňující vliv navážky PCh na velikost částic.....	41
Obrázek 6: Graf znázorňující vliv navážky PCh na PDI částic .....	41
Obrázek 7: Graf znázorňující vliv složení lipidické formulace na velikost částic ...	42
Obrázek 8: Graf znázorňující vliv složení lipidické formulace na PDI částic.....	43
Obrázek 9: Graf znázorňující vliv množství čištěné vody k rehydrataci na velikost částic .....	44
Obrázek 10: Graf znázorňující vliv množství čištěné vody k rehydrataci na PDI částic .....	44
Obrázek 11: Graf znázorňující vliv složení organické fáze na velikost částic .....	45
Obrázek 12: Graf znázorňující vliv složení organické fáze na PDI částic .....	46
Obrázek 13: Graf znázorňující velikost částic v průběhu sonikace.....	47
Obrázek 14: Graf znázorňující PDI částic v průběhu sonikace .....	47
Obrázek 15: Graf znázorňující velikost částic u vzorků obsahujících GENT v různých časech sonikace .....	48
Obrázek 16: Graf znázorňující PDI částic u vzorků obsahujících GENT v různých časech sonikace.....	48

## 12 Seznam tabulek

Tabulka 1: složení vzorků, u kterých byl jako rozpouštědlo použitý MeOH.....	34
Tabulka 2: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl <sub>3</sub> v poměru 1:1 .....	35
Tabulka 3: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl <sub>3</sub> v poměru 1:10 .....	35
Tabulka 4: složení vzorků, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl <sub>3</sub> v poměru 3:7 .....	35
Tabulka 5: složení vzorků s přidavkem cholesterolu, u kterých byla rozpouštědlem směs MeOH:CCl <sub>3</sub> v poměru 3:7 .....	35
Tabulka 6: složení vzorků s enkapsulovaným roztokem GENT .....	36
Tabulka 7: hodnoty naměřené u vzorků 1 až 16 .....	39
Tabulka 8: hodnoty naměřené u vzorků 17 až 19, obsahujících enkapsulovaný GENT .....	40

## 13 Použitá literatura

- ABED, Nadia a COUVREUR, Patrick, 2014. Nanocarriers for antibiotics: A promising solution to treat intracellular bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 43, č. 6, s. 485–496. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.009.
- ARAJO LOPES, Svía Caldeira De et al., 2013. Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. In: RANGEL, Leticia (ed.), *Cancer Treatment- Conventional and Innovative Approaches*. InTech. ISBN 978-953-51-1098-9. DOI 10.5772/55290.
- ARANA, Lide, GALLEGO, Lucia a ALKORTA, Itziar, 2021. Incorporation of Antibiotics into Solid Lipid Nanoparticles: A Promising Approach to Reduce Antibiotic Resistance Emergence. *Nanomaterials*. Vol. 11, č. 5, s. 1251. DOI 10.3390/nano11051251.
- AZAM, Ameer et al., 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. s. 6003. DOI 10.2147/IJN.S35347.
- BALDERRAMA-GONZÁLEZ, Andrea-Sarahí et al., 2021. Antimicrobial Resistance and Inorganic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 22, č. 23, s. 12890. DOI 10.3390/ijms222312890.
- BOAS, Ulrik a HEEGAARD, Peter M. H., 2004. Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*. Vol. 33, č. 1, s. 43. DOI 10.1039/b309043b.

- BOZZUTO, Giuseppina a MOLINARI, Agnese, 2015. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*. s. 975. DOI 10.2147/IJN.S68861.
  
- BRIUGLIA, Maria-Lucia et al., 2015. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*. Vol. 5, č. 3, s. 231–242. DOI 10.1007/s13346-015-0220-8.
  
- BRUNA, Tamara et al., 2021. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 22, č. 13, s. 7202. DOI 10.3390/ijms22137202.
  
- CELLI, J. a ZAHRT, T. C., 2013. Mechanisms of Francisella tularensis Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Vol. 3, č. 4, s. a010314–a010314. DOI 10.1101/cshperspect.a010314.
  
- COLINO, Clara I., LANAO, José M. a GUTIERREZ-MILLAN, Carmen, 2020. Targeting of Hepatic Macrophages by Therapeutic Nanoparticles. *Frontiers in Immunology*. Vol. 11, s. 218. DOI 10.3389/fimmu.2020.00218.
  
- COSSART, Pascale, 2011. Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 108, č. 49, s. 19484–19491. DOI 10.1073/pnas.1112371108.
  
- DHEDA, Keertan et al., 2017. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine*. Vol. 5, č. 4, s. 291–360. DOI 10.1016/S2213-2600(17)30079-6.

- DOUGLAS, A.E., 2009. Endosymbionts and Intracellular Parasites. In: *Encyclopedia of Microbiology*, s. 128–141. Elsevier. ISBN 978-0-12-373944-5. DOI 10.1016/B978-012373944-5.00257-1.
  
- DUA, J S, RANA, A C a BHANDARI, Dr A K., 2012. Liposome: Methods of Preparation and Applications. In: *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. E-ISSN 2229-4619. Dostupné z: <https://romanpub.com/resources/ijpsr%20v11-2020-6.pdf>.
  
- GARCÍA-GALLEGO, Sandra et al., 2017. Function Oriented Molecular Design: Dendrimers as Novel Antimicrobials. *Molecules*. Vol. 22, č. 10, s. 1581. DOI 10.3390/molecules22101581.
  
- GARZONI, Christian a KELLEY, William L., 2009. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. *Trends in Microbiology*. Vol. 17, č. 2, s. 59–65. DOI 10.1016/j.tim.2008.11.005.
  
- GHARPURE, Saeed, AKASH, Aman a ANKAMWAR, Balaprasad, 2020. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. Vol. 20, č. 6, s. 3303–3339. DOI 10.1166/jnn.2020.17677.
  
- GILLIES, E a FRECHET, J, 2005. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*. Vol. 10, č. 1, s. 35–43. DOI 10.1016/S1359-6446(04)03276-3.
  
- GIULIANI, Andrea, PIRRI, Giovanna a NICOLETTO, Silvia, 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*. Vol. 2, č. 1, s. 1–33. DOI 10.2478/s11535-007-0010-5.

- GRANT, Sarah Schmidt a HUNG, Deborah T., 2013. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. Vol. 4, č. 4, s. 273–283. DOI 10.4161/viru.23987.
  
- HAJIPOUR, Mohammad J. et al., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. Vol. 30, č. 10, s. 499–511. DOI 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
  
- HANEY, Evan F., MANSOUR, Sarah C. a HANCOCK, Robert E. W., 2017. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: HANSEN, Paul R. (ed.), *Antimicrobial Peptides*, s. 3–22. New York, NY: Springer New York. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-4939-6735-3. DOI 10.1007/978-1-4939-6737-7\_1.
  
- CHEN, Yingying et al., 2024. Strategies for the eradication of intracellular bacterial pathogens. *Biomaterials Science*. Vol. 12, č. 5, s. 1115–1130. DOI 10.1039/D3BM01498C.
  
- JIANG, Lai et al., 2018. Clearance of intracellular *Klebsiella pneumoniae* infection using gentamicin-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 279, s. 316–325. DOI 10.1016/j.jconrel.2018.04.040.
  
- KAMARUZZAMAN, Nor Fadhillah, KENDALL, Sharon a GOOD, Liam, 2017. Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 174, č. 14, s. 2225–2236. DOI 10.1111/bph.13664.
  
- KYAW, Kaung et al., 2017. Effects of pulsed laser irradiation on gold-coated silver nanoplates and their antibacterial activity. *Nanoscale*. Vol. 9, č. 41, s. 16101–16105. DOI 10.1039/C7NR06513B.

- LEHAR, Sophie M. et al., 2015. Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. Vol. 527, č. 7578, s. 323–328. DOI 10.1038/nature16057.
  
- LI, Jing et al., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 10, č. 2, s. 81–98. DOI 10.1016/j.ajps.2014.09.004.
  
- LIU, Yuan et al., 2020. Heterogeneous Strategies to Eliminate Intracellular Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11, s. 563. DOI 10.3389/fmicb.2020.00563.
  
- MAHMOOD, Syed, MANDAL, Uttam Kumar, CHATTERJEE, Bappaditya and TAHER, Muhammad. “Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: investigating their properties through the techniques used in their evaluations” *Nanotechnology Reviews*, vol. 6, no. 4, 2017, pp. 355-372. DOI 10.1515/ntrev-2016-0050
  
- MARIATHASAN, Sanjeev a TAN, Man-Wah, 2017. Antibody–Antibiotic Conjugates: A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections. *Trends in Molecular Medicine*. Vol. 23, č. 2, s. 135–149. DOI 10.1016/j.molmed.2016.12.008.
  
- MITCHELL, Gabriel, CHEN, Chen a PORTNOY, Daniel A., 2016. Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages. GORDON, Siamon (ed.), *Microbiology Spectrum*. Vol. 4, č. 3, s. 4.3.05. DOI 10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015.

- MU, Haibo et al., 2016. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Scientific Reports*. Vol. 6, č. 1, s. 18877. DOI 10.1038/srep18877.
  
- NAMIOT, Eugenia D. et al., 2023. Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 24, č. 1, s. 787. DOI 10.3390/ijms24010787.
  
- NSAIRAT, Hamdi et al., 2022. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. Vol. 8, č. 5, s. e09394. DOI 10.1016/j.heliyon.2022.e09394.
  
- PETERS, Brian M., SHIRTLIFF, Mark E. a JABRA-RIZK, Mary Ann, 2010. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? MADHANI, Hiten D. (ed.), *PLoS Pathogens*. Vol. 6, č. 10, s. e1001067. DOI 10.1371/journal.ppat.1001067.
  
- PRADHAN, Bhupendra et al., 2015, Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, Vol. 3, č. 2348, s. 01-08. Retrieved from <https://www.japtronline.com/index.php/joapr/article/view/54>
  
- RATHMAN, M, SJAASTAD, M D a FALKOW, S, 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infection and Immunity*. Vol. 64, č. 7, s. 2765–2773. DOI 10.1128/iai.64.7.2765-2773.1996.

- SCOTT, Andrew M., WOLCHOK, Jedd D. a OLD, Lloyd J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 12, č. 4, s. 278–287. DOI 10.1038/nrc3236.
  
- SERAL, C., 2003. Influence of P-glycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 51, č. 5, s. 1167–1173. DOI 10.1093/jac/dkg223.
  
- SILVA, Manuel T. a SILVA PESTANA, Nazaré T., 2013. The in vivo extracellular life of facultative intracellular bacterial parasites: Role in pathogenesis. *Immunobiology*. Vol. 218, č. 3, s. 325–337. DOI 10.1016/j.imbio.2012.05.011.
  
- STOREK, Kelly M. et al., 2018. Monoclonal antibody targeting the  $\beta$ -barrel assembly machine of *Escherichia coli* is bactericidal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 115, č. 14, s. 3692–3697. DOI 10.1073/pnas.1800043115.
  
- ŠTURM, Luka a POKLAR ULRIH, Nataša, 2021. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 22, č. 12, s. 6547. DOI 10.3390/ijms22126547.
  
- TULKENS, P. M., 1991. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Vol. 10, č. 2, s. 100–106. DOI 10.1007/BF01964420.

- VARKOUHI, Amir K. et al., 2011. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*. Vol. 151, č. 3, s. 220–228. DOI 10.1016/j.jconrel.2010.11.004.
  
- WANG, Chao et al., 2023. Nanocarriers for the delivery of antibiotics into cells against intracellular bacterial infection. *Biomaterials Science*. Vol. 11, č. 2, s. 432–444. DOI 10.1039/D2BM01489K.
  
- ZHANG, L. et al., 2010. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 17, č. 6, s. 585–594. DOI 10.2174/092986710790416290.