UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

POLYMERNÍ NANOČÁSTICE JAKO PLATFORMA PRO DODÁNÍ ANTIBIOTIK

Polymeric nanoparticles: platform for antibiotic drugs delivery

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2025 Zdeňka Miliánová

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

V Hradci Králové dne .....

Zdeňka Miliánová

Poděkování

Děkuji PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za vlídné vedení, pomoc při překonávání překážek a cenné rady při zpracovávání práce, PharmDr. Lukáši Lochmanovi, Ph.D. za vývoj a optimalizaci metody pro HPLC analýzu gentamicinu a pomoc při stanovení jeho obsahu, Dmytru Iefremenkovi, M.Sc. za pomoc při vývoji derivatizační reakce s ninhydrinem pro spektrální metodu stanovení obsahu gentamicinu, a především svým přátelům a rodině za ohromnou podporu, a hlavně vám všem děkuji a vážím si vaší neskonalé trpělivosti a pevných nervů.

Abstrakt

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie
Školitel:
PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.
PharmDr. Lukáš Lochmann, Ph.D.
Posluchač: Zdeňka Miliánová

Název diplomové práce: Polymerní nanočástice jako platforma pro dodání antibiotik

Nanočástice připravené z biologicky rozložitelného polymeru poly(mléčné-ko-glykolové) kyseliny (PLGA) se používají pro cílenou terapii bakteriálních infekcí. Takto se zvyšuje nízká buněčná biologická dostupnost aminoglykosidů. Optimálními vlastnostmi těchto nanočástic pro pasivní targeting do makrofágů jsou jejich hydrofobní charakter s negativním povrchovým nábojem a velikost v rozmezí od 100–300 nm, PDI pod 0,1 či v rozmezí 0,2 – 0,3 PDI. Připravili jsme PLGA nanočástice s enkapsulovaným gentamicinem dvojitě emulzní odpařovací metodou. Kyselinou terminované PLGA s ekvimolárním množstvím kyseliny mléčné a glykolové bylo použité pro přípravu nanotobolek. Zhodnotili jsme velikost, index polydisperzity, kapacitu naplnění léčivem a enkapsulační efektivitu léčiva v nanočásticích. Pro tento účel byla vyvinuta nová HPLC metoda s předkolonovou derivatizací. Pro přípravu vhodné formulace byla testována organická rozpouštědla, druh a koncentrace surfaktantu. Velikost a PDI připravených nanočástic se pohybovala v tomto pořadí v rozmezí mezi 246,8 nm – 5,35 µm a 0,068 – 0,662. Optimálních granulometrických vlastností bylo dosaženo použitím organických rozpouštědel dichlormethanu, ethylacetátu nebo chloroformu a surfaktantu PVA. Nejlepší enkapsulační efektivita dosáhla přibližně 25,7 %.

Klíčová slova: nanočástice, biologická rozložitelnost, PLGA, dvojitě emulzní odpařovací metoda, gentamicin, intracelulární bakterie, Fmoc-Cl, HPLC, spektrofotometrie

Abstract

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Technology
Supervisor:
PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.
PharmDr. Lukáš Lochmann, Ph.D.
Student: Zdeňka Miliánová

Title of diploma thesis: Polymeric nanoparticles: platform for antibiotic drugs delivery

Nanoparticles prepared from biodegradable polymer poly (lactide-co-glycolic acid) (PLGA) are useful for targeted drug therapy of bacterial infections. This increases poor cellular bioavailability of aminoglycosides. Optimal properties of these nanoparticles for passive targeting to macrophages are their hydrophobic character with negative surface charge ang size in the range of 100 nm to 300 nm, PDI under 0,1 or in the range of 0,2 – 0,3 PDI. We prepared gentamicin loaded PLGA nanoparticles by double emulsion solvent evaporation method. Acid terminated PLGA with equimolar lactic to glycolic acid ratio was used for preparation of nanocapsules. We evaluated the size, polydispersity index, drug loading capacity and encapsulation efficiency of the drug in the nanoparticles. Novel HPLC method with pre column derivatization was developed for this purpose. Organic solvents, a type and concentration of surfactants were tested in order to prepare suitable formulation. Size and PDI of prepared nanoparticles were ranging between 246,8 nm – 5,35 µm and 0,068 – 0,662 respectively. Optimal granulometric properties were achieved using organic solvents dichlormethan, ethylacetate or chloroform and surfactant PVA. The best encapsulation efficiency achieved was approximately 25,7 %.

Key words: nanoparticles, biodegradability, PLGA, double emulsion solvent evaporation method, gentamicin, intracellular bacteria, Fmoc-Cl, HPLC, spectrophotometry

Obsah

1 Úvod 1

2 Teoretická část 2

2.1 Nanočástice jako nosiče léčiv 2

2.2 Typy nanonosičů 2

2.2.1 Liposomy 3

2.2.2 Pevné lipidové nanočástice 3

2.2.3 Uhlíkaté nanotrubičky 3

2.2.4 Micely 4

2.2.5 Dendrimery 4

2.2.6 Polymerní nanočástice 5

2.3 Biodegradovatelné polymery 6

2.3.1 Polyestery 7

Poly(α–hydroxykyseliny) 7

Poly(ε-kaprolakton) 8

2.3.2 Poly(alkylkyanoakrylát) 9

2.3.3 Polysacharidy 9

Chitosan 9

Algináty 9

2.4 Metody přípravy polymerních nanočástic 10

2.4.1 Emulzní odpařovací metoda 10

Dvojitě emulzní odpařovací metoda 11

2.5 Mechanismy uvolňování léčiv z polymerních nanočástic 11

2.6 Cílená distribuce nanočástic 13

2.6.1 Pasivní targeting 14

2.6.2 Aktivní targeting 15

2.7 Infekční onemocnění 16

2.7.1 Vybrané intracelulární patogeny 16
2.7.2 Strategie intracelulárního přežití bakterií 18
2.8 Terapeutické přístupy k eradikaci intracelulárních patogenů 20
3 Cíl práce 25
4 Experimentální část 26
4.1 Použité přístroje 26
4.2 Použité suroviny 26
4.3 Metody 27
4.3.1 Příprava NP – dvojitě emulzní odpařovací metoda 27
4.3.2 Proces přípravy nanočástic 28
4.3.3 Zpracování a uchování vzorků nanočástic 29
4.3.4 Měření velikosti částic a indexu polydisperzity 29
4.3.5 Měření enkapsulační efektivity a drug – loading 29
4.3.5.3 HPLC – FLD analýza experimentální podmínky 31
4.3.5.4 Spektrální analýza a derivatizace vzorků ninhydrinem 35
5 Výsledky a diskuse 37
6 Závěr 46
7 Seznam obrázků, grafů, rovnic a tabulek 47
8 Seznam zkratek 48
9 Literatura 50

1 Úvod

Nanotechnologie a příprava nanočástic je rychle rozvíjející se odvětví s širokou škálou uplatnění v mnoha vědních oborech. Jedním z těchto oborů jsou i farmaceutické vědy. Z důvodu vysokého potenciálu nanočástic pro další použití v medicíně probíhá jejich intenzivní vývoj. Použití nanočástic jako systém pro cílenou terapii v místě účinku umožňuje účinnější a bezpečnější terapii a zároveň dochází ke snížení zátěže možných negativ a rizik spojených s danou léčbou. Formulací účinné látky do nanonosiče se zlepšuje biologická dostupnost léčiva, tím pádem není zapotřebí podávat tak vysoké dávky a zároveň dochází ke zmenšení výskytu nežádoucích účinků a toxicity účinné látky. Pro toto použití nanočástic je zapotřebí, aby splňovaly požadavky kompatibility, neimunogenity a své biologické rozložitelnosti.

Nanočástice jsou z důvodů svých vlastností hojně využívané v diagnostice, chemoterapii, fototerapii, imunoterapii, genové terapii, teranostice, vakcinací, v tkáňovém inženýrství a v terapii zánětlivých a infekčních onemocnění.

Terapie infekčních onemocnění se zakládá na podávání antibiotik. Pro antibiotickou léčbu je na výběr široká škála antibiotik s různými mechanismy účinku, avšak účinnost antibiotické léčby postupně klesá z důvodu klesání citlivosti patogenů k podávaným antibiotikům a rozvoji antibiotické rezistence. Toto je způsobené jejich nadužíváním, nesprávnou indikací pro léčbu antibiotiky. Evolucí, vznikem a zvyšováním výskytu odolnějších rezistentních bakterií se léčba a jejich eradikace stává složitější. Z těchto důvodů jsou podávány rezervní antibiotika, na která taktéž postupně vzniká rezistence, a tím se zvyšuje riziko vyčerpání možností pro léčbu infekčních onemocnění. Z těchto důvodů je důležité hledání nových terapeutických strategií, mezi které patří příprava nanočástic fungující jako platforma pro dodání antibiotik přímo do místa účinku.

2 Teoretická část

2.1 Nanočástice jako nosiče léčiv

Nanotechnologie je rychle rozvíjející se obor, který je uplatňován v široké škále odvětví od používání v elektronice do fotoniky, ve vodivých materiálech do senzorů, v enviromentálních technologiích ke kontrole znečištění, a také i v medicínské aplikaci [1, 2]. V medicínských oborech se nanomateriály používají také k celé řadě aplikací, které zahrnují diagnostické biosenzory, zvýšení rozlišovacích schopností zobrazovacích metod, scafoldy pro tkáňové inženýrství, a především systémy pro dodání léčiv. Velikost částic nanonosičových systému se pohybuje v rozmezí od 1–1000 nm. Nanonosičové systémy se využívají jako nosiče široké škály léčiv např: malá hydrofilní či hydrofobní léčiva, proteiny, vakcíny a nukleotidy pro jejich cílené podávání do konkrétních buněk či orgánů v místě terapeutického účinku, v potřebném množství a ve správný čas pomocí aktivního či pasivního targetingu nanočástic. Hlavními výhodami jsou zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodě a zvýšená biologická dostupnost. Jejich cílená distribuce zvyšuje účinnost léčiva, snižuje nežádoucí účinky a toxicitu léčiva, zároveň je léčivo chráněno před degradací a umožňuje prodloužené uvolňování léčiva. Schopnost nanočástic cílené distribuce umožňuje jejich používání v teranostice nádorů, regenerativní medicíně, vakcinaci, v terapii nádorových, kardiovaskulárních, cerebrálních, zánětlivých a infekčních onemocnění. [1–5]

2.2 Typy nanonosičů

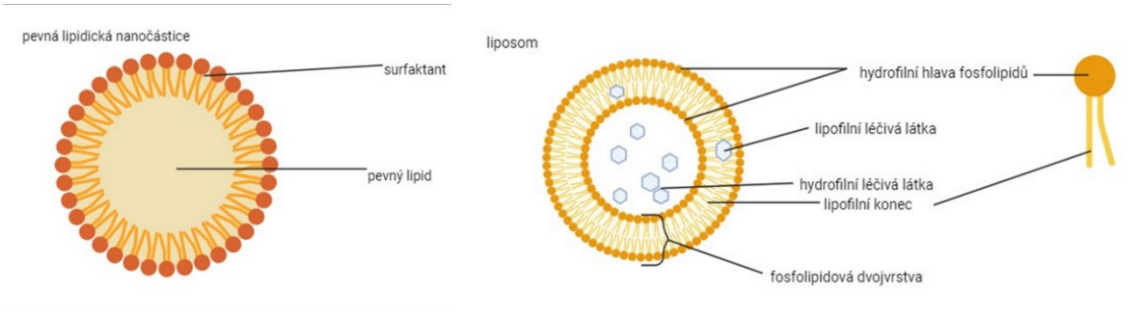
Terapeutické nanočástice se dělí do dvou hlavních kategorií nanokrystatů a nanostruktur. Nanostrukturované materiály se dále dělí do polymerních, anorganických a lipidických nanočástic. Lipidické nanočástice zahrnují liposomy a pevné lipidické nanočástice. Anorganické nanočástice se dělí na uhlíkaté nanotrubičky, metalické nanočástice, nanodiamanty, nanočástice tvořené z oxidu křemičitého a kvantové tečky. Mezi polymerní nanočástice se řadí polymerní nanočástice, polymerní micely, denrimery, nanogely, proteinové nanočástice a lékové konjugáty [6].

2.2.1 Liposomy

Liposomy jsou vezikuly tvořené jednou či více dvojvrstvami z přírodních nebo syntetických fosfolipidů. Jejich struktura se podobá buněčné membráně tzn. hydrofobní lipidické řetězce se shlukují k sobě a hydrofilní hlavy části fosfolipidů tvoří vnější i vnitřní povrch liposomu viz. Obrázek 1. Velikost nejjednoduššího liposomu složeného z lipidové dvojvrstvy s dutým jádrem se pohybuje od 50–1000 nm. Do liposomů lze enkapsulovat hydrofilní a hydrofobní léčiva. Liposomy jsou využívané pro svou schopnost fúze s buněčnou membránou a uvolněním svého obsahu do cytoplazmy. Této vlastnosti se využívá pro cílené podávání léčiv. Pro prodloužení cirkulační doby liposomů v prostředí organismu a zlepšení cíleného podávání léčiv se využívá modifikací povrchu liposomů hydrofilními polymery např. jejich PEGylací. [1, 6]

2.2.2 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice jsou koloidní disperze o velikosti od 10–1000 nm, které umožňují zvýšení biodostupnosti lipofilních léčiv. Struktura pevných lipidových nanočástic je založena na použití pevných lipidů, které zůstávají pevné při laboratorní i tělesné teplotě a surfaktantů pro zvýšení stability systému viz. Obrázek 1. V současnosti jsou to velmi intenzivně studované vektory pro genovou terapii, dále pro přenos protinádorových, plicních a perorálních léčiv. [1, 6, 7]

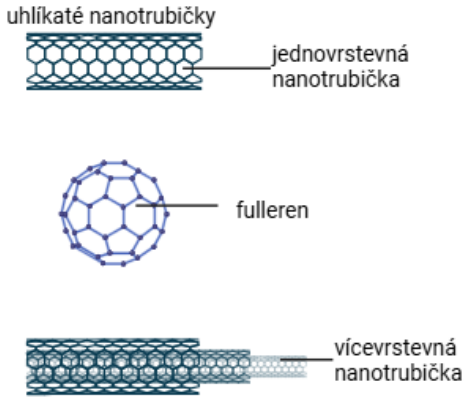


Obrázek 1: Struktury lipidových nanočástic (Created in https://BioRender.com)

2.2.3 Uhlíkaté nanotrubičky

Uhlíkaté nanotrubičky jsou trubicové struktury o průměru 1nm a délce 1–100 nm. Tyto struktury na bázi uhlíku vznikají svinutím grafenové vrstvy do souvislého válce. Konfigurace uhlíkatých nanotrubiček zahrnuje nanotrubičky tvořené z jedné vrstvy,

z více vrstev a C60 fullereny viz. Obrázek 2 [6]. Jednovrstevné nanotrubičky a C60 fullereny mají vnitřní průměr 1–2 nm, který je srovnatelný s polovinou průměru DNA helix, což jim umožňuje vstup do buněk endocytózou, nebo přímý vstup přes buněčnou membránu. Zároveň jsou schopné absorbovat elektrony přes jádro fullerenu. Toto jim umožňuje pohlcovat volné radikály – reaktivní formy kyslíku (ROS). Fullereny mohou být použité pro přenos antibiotik, protinádorových a antivirových léčiv, a také jako biosenzory. [1, 6, 8]



Obrázek 2: Struktury anorganických nanočástic – uhlíkaté nanotrubičky (Created in https://BioRender.com)

2.2.4 Micely

Micely jsou koloidní struktury o velikosti od 10–100 nm, které se skládají z hydrofilního obalu a lipofilního jádra viz. Obrázek 3. Vznikají po překročení kritické micelární koncentrace. Mohou být připravované z materiálů na bázi lipidů nebo polymerů. Polymerní micely se skládají z amfifilních blokových kopolymerů. Vnitřní lipofilní část micely umožňuje enkapsulaci lipofilního léčiva a vnější hydrofilní část micely tvoří ochranu enkapsulovaného léčiva před opsonizací retikuloendoteliálním systémem (RES). [1, 6, 9]

2.2.5 Dendrimery

Dendrimery jsou vysoce rozvětvené trojrozměrné polymerní makromolekuly s dutinami mezi jednotlivými větveními polymerů, do kterých je možné uzavřít léčivé látky a zároveň také je možné je enkapsulovat na povrch dendrimerů. Skládají se z jádra a vrstev opakujících se jednotek tzv. dendronů viz. Obrázek 3. Z důvodu přípravy dendrimerů kontrolovaným rozvětvováním monomeru je možné připravit nanočástice

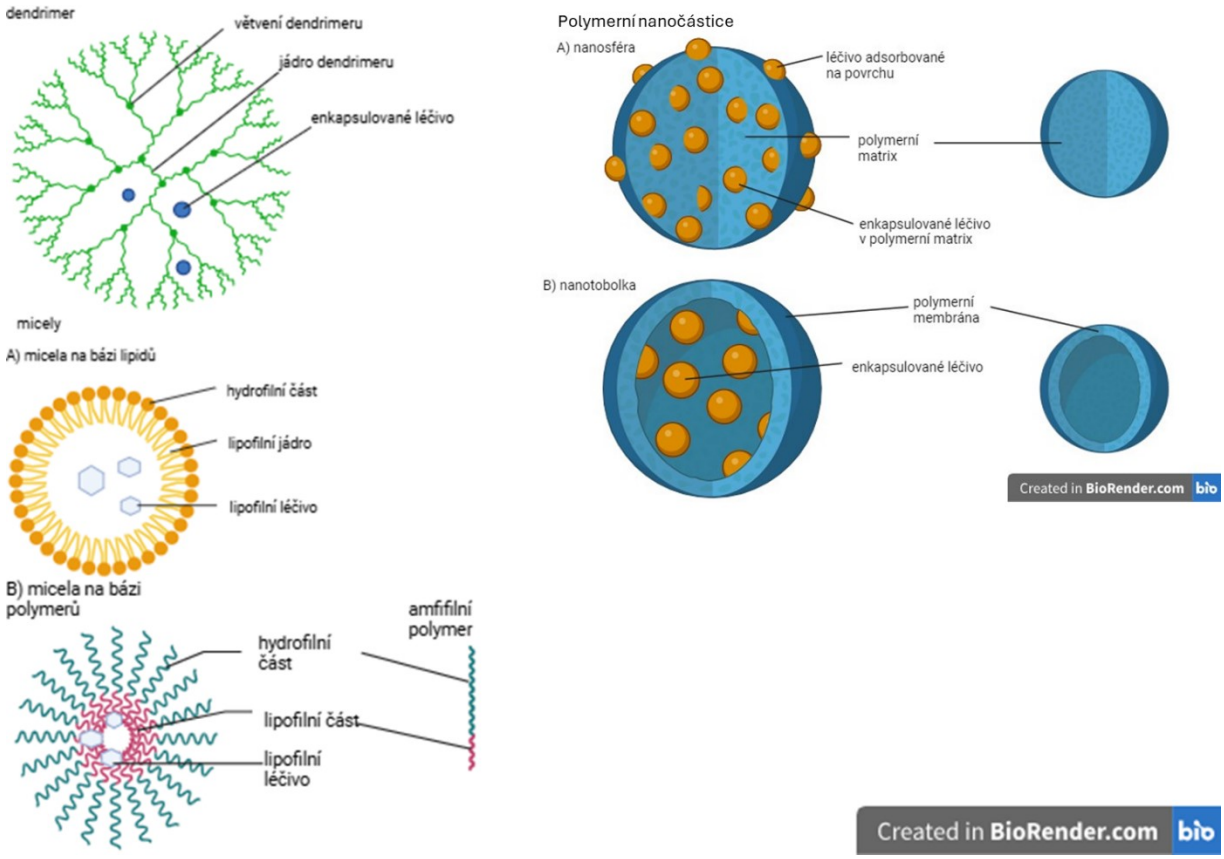
o velikosti 1–5 nm. Jejich výhodou je vysoká monodisperzita, kontrolovatelná velikost a struktura. Dendrimery jsou používané v dermální, perorální, oční a plicní aplikaci léčiv a cílené dodání protinádorových léčiv do místa účinku. [1, 6, 9–11]

2.2.6 Polymerní nanočástice

Polymerní nanočástice jsou pevné koloidní částice o velikosti v rozmezí 10–1000 nm. Mohou se klasifikovat jako nanosféry nebo nanotobolky. Nanosféry se skládají z matricové struktury polymeru, tj. celá hmota částice je pevná, léčivá látka je v ní dispergovaná nebo naadsorbovaná na povrch nanosféry. Nanotobolky jsou vezikulární útvary, které fungují jako zásobníky. Jsou tvořené polymerní membránou a dutinou, ve které je uzavřená účinná látka. Nanotobolky mohou mít taktéž na povrchu polymeru adsorbovanou léčivou látku (Obr. 3). [1, 2, 6]

Polymerní nanočástice jsou připravované z přírodních nebo syntetických polymerů. Přírodní polymery se příliš nevyužívají z důvodu jejich rozdílné čistoty a často je vyžadováno jejich zesíťování, které může způsobit denaturaci enkapulovaného léčiva. Mezi přírodní polymery patří albumin, kolagen, želatina, proteiny přítomné v hedvábí – fibroin a secerin, keratin, alginát a chitosan [3, 12]. Při přípravě polymerních nanočástic nalezly větší uplatnění syntetické polymery. Ty lze dále rozdělit na biodegradovatelné a biologicky nerozložitelné polymery. Mezi nebiodegradovatelné polymery patří polyakrylamid a polymetakrylát, u kterých hrozí riziko vzniku chronické toxicity z důvodu jejich hromadění v tkáních a uvnitř buněk [3].

Z tohoto důvodu biodegradovatelné polymery nacházejí své využití častěji než biologicky nerozložitelné polymery. Mezi biologicky rozložitelné polymery se řadí polyestery – kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kyselina poly(mléčná-ko-glykolová) (PLGA), poly(ε-kaprolakton) (PCL) a poly(alkylkyanoakrylát) (PACA) – a polysacharidy, mezi které patří alginát a chitosan. Široký výběr z polymerů umožňuje vybrat vhodný polymer pro přípravu nanočástic, který splní požadavky na biologickou rozložitelnost, biokompatibilitu k tkáním a krvi a na neimunogenitu a zároveň bude vhodně enkapsulovat nebo vázat zvolené léčivo. [3, 12–14]

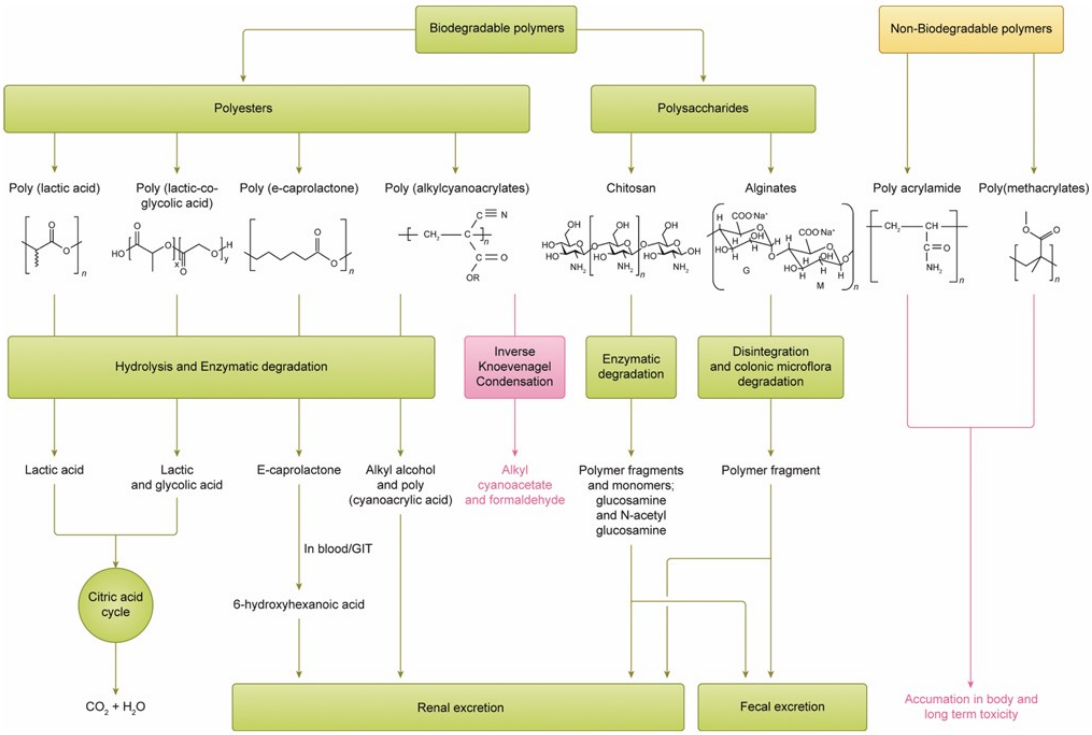


Obrázek 3: Schéma polymerních nanočástic (Created in https://BioRender.com)

2.3 Biodegradovatelné polymery

Biologicky rozložitelné polymerní nanočástice jsou upřednostňované před anorganickými nanočásticemi během dlouhodobého podávání nanočástic. Biodegradovatelné polymery jsou atraktivní pro terapeutické použití nanočástic z důvodů své biologické kompatibility a biologické rozložitelnosti. Dalšími důvody oblíbenosti většího uplatnění polymerních nanočástic v cíleném podávání jsou jejich schopnosti enkapsulace léčiv do jádra nanočástice, a proto tvoří ochranu enkapsulovené látky před

degradací, zlepšují biologickou dostupnost a retenční čas. [3]. Na obrázku 4 jsou znázorněné metabolické cesty rozkladu biologicky rozložitelných polymerů.



Obrázek 4: Metabolické cesty rozkladu biologicky rozložitelných polymerů [3]

2.3.1 Polyestery

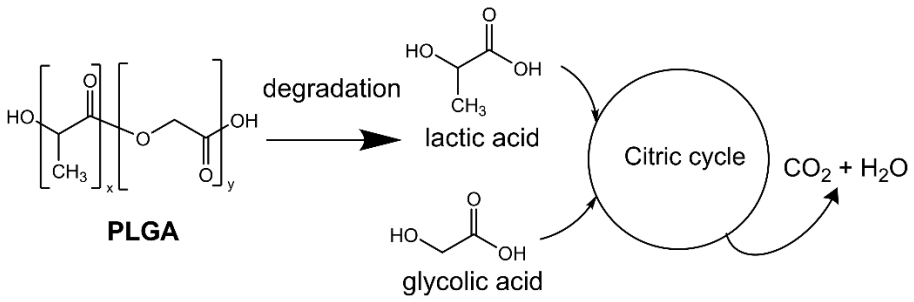
Alifatické polyestery jsou široce používané v biomedicínských, farmaceutických a enviromentálních odvětvích pro svou přirozenou hydrolytickou nestabilitu, syntetizované různými způsoby z rozmanitých monomerů a s širokou škálou vlastností polykondenzací nebo ring-openning polymerizací. Nejvíce studovanými a používanými polyestery jsou PLA, PGA, PLGA, poly(hydroxylalkanoáty) (PHA) a PCL [15].

Poly(α–hydroxykyseliny)

Mezi poly(α-hydroxykyseliny) patří PLA a PLGA, které byly schváleny FDA jako GRAS (Generally recognized as safe) obecně schválené jako bezpečné pro humánní terapeutické použití. [3, 16]

Jedná se o lineární, alifatické, syntetické polyestery, které mají hydrofobní charakter. PLA je homopolymerem monomerů kyseliny mléčné, naopak PLGA je kopolymerem monomerů kyseliny mléčné a glykolové, které jsou taktéž spojeny

esterickou vazbou. Na rozdíl od PLGA se PLA vyznačuje vyšší hydrofobicitou. Přítomnost esterických vazeb tvořících kostru polymeru umožňuje ve vodném prostředí jeho degradaci hydrolytickou reakcí, jejímiž produkty jsou kyselina mléčná a v případě PLGA i kyselina glykolová, které následně putují k metabolizaci do Krebsova cyklu, ve kterém se rozloží na CO_2 a H_2O viz. Obrázek 5. [3, 4, 16]



Obrázek 5: Schéma rozkladu PLGA

Poly(ε-kaprolakton)

Poly(ε-kaprolakton) (PCL) je netoxický, biologicky rozložitelný, biokompatibilní alifatický polyester, který se v organismu eliminuje hydrolýzou na ε-kaprolakton a tento vedlejší produkt se dále v krvi a žaludku hydrolyticky rozkládá na 6-hydroxyhexanovou kyselinu. 6-hydroxyhexanová kyselina je následně renálně vyloučena z důvodu její dobré rozpustnosti ve vodě. [3, 16, 17]

PCL pomaleji absorbuje vodu v porovnání s ostatními méně hydrofobními polyestery jako například PLGA a PLA, tím dochází k pomalejší degradaci. Zároveň jeho vysoká teplota tání a nízká teplota skelného přechodu mají za následek semikrystalickou strukturu PCL, která zapříčiňuje vyšší odolnost a delší setrvání v organismu. Tyto vlastnosti umožňují použití PCL v dlouhodobě implantovaných zařízeních s pomalejším uvolňováním léčiv v řádu dnů až několika měsíců. Naopak pro rychlejší degradaci, vyšší efektivitu uvolňování léčiva a možnost přípravy nanočástic ve vodním prostředí se připravují blokové kopolymery s hydrofilními polymery např: nejčastěji polyester-polyether (PCL-PEG) poly(ε-kaprolakton)-b-poly(ethylen glykol). PEGylace okolo hydrofobního jádra PCL zvyšuje amfifilitu a tím rychlost biodegradace.[18, 19]

2.3.2 Poly(alkylkyanoakrylát)

Kyanoakryláty se skládají z akrylových monomerů např: ethyl, n-butyl či oktyl kyanoakrylát, které schválila pro použití americká FDA. Degradace PACA probíhá hydrolýzou vedlejších esterových vazeb na alkylalkohol a poly(kyanoakrylovou kyselinu), která je vyloučena ledvinami kvůli její rozpustnosti. Dalším možným způsobem degradace PACA je tzv. inverzní Knoevenagelova kondenzační reakce. Rozkladnými produkty této reakce jsou alkylkyanoacetát a formaldehyd, které jsou toxické, avšak tento metabolický děj probíhá velmi pomalu a výjimečně ve fyziologickém pH. [3]

2.3.3 Polysacharidy

Chitosan

Chitosan je deacetylovanou formou chitinu, α(1-4)-2-amino-2-deoxy β-D-glukan, který je obsažen v krunýřích korýšů. Rozkládán je pravděpodobně lysozymem, bakteriálními enzymy ve střevě, a navíc lidskými chitinásami. Degradace polymeru závisí na jeho molekulové hmotnosti a stupni deacetylace. [3, 20]

Algináty

Algináty jsou podobné polysacharidu chitosanu. Jedná se o anionické biopolymery skládající se z lineárních řetězců α-L-glukuronové kyseliny (G) a β-D-manuronové kyseliny (M), které jsou dohromady spojené 1,4 - vazbami. Taktéž jsou bezpečné, netoxické, hydrofilní a biologicky rozložitelné. Získávají se extrakcí z hnědých řas. Degradace alginátů probíhá pomocí střevní mikroflóry a dezintegrací na polymerní fragmenty, které jsou vyloučeny renální a jaterní exkrecí. [3]

Pro přípravu nanočásticových nosičů léčiv mohou být využity další biodegradabilní polymery, mezi které patří škrob, želatina, albumin anebo polyanhydridy.[3]

2.4 Metody přípravy polymerních nanočástic

Polymerní nanočástice můžeme připravit dvěma různými postupy. První metoda představuje připravení nanočástic pomocí polymerizace monomerů a druhá metoda je založená na vytvoření disperzí z již existujících polymerů. Polymerizaci monomerů můžeme uskutečnit několika způsoby, a to mikro – emulzifikací, mini – emulzifikací, polymerizací na rozhraní, surfaktant free – emulzifikací. Naopak metody přípravy polymerních nanočástic z polymerů zmenšováním jejich velikosti rozdělujeme na emulzní odpařovací metodu, vysolování, nanoprecipitaci, dialýzu a technologii superkritických tekutin. Při přípravě polymerních nanočástic z monomerů může docházet k jejich kontaminaci nezreagovanými monomery, surfaktanty, nebo organickými rozpouštědly, proto je výhodnější příprava nanočástic z již syntetizovaných a přečištěných polymerů. [2, 3]

Z důvodu přípravy polymerních nanočástic v rámci řešení experimentální části této práce dvojitě emulzní odpařovací metodou, bude další část textu věnována pouze této metodě.

2.4.1 Emulzní odpařovací metoda

Emulzní odpařovací metoda je založená na přípravě emulze, ze které je následně odpařené organické rozpouštědlo polymeru ze spojité fáze během procesu solidifikace s výslednou tvorbou suspenze nanočástic. Pro tvorbu emulze se využívá ultrasonikace nebo vysokorychlostní homogenizace, která je poté následována krokem odpařování rozpouštědla a solidifikací vzniklých nanočástic. Odpařování rozpouštědla organické fáze může probíhat za normálního tlaku při laboratorní teplotě za stálého míchání anebo za sníženého tlaku. Takto připravené polymerní nanočástice mohou být dále centrifugovány, po centrifugaci promyty čištěnou vodou pro odstranění surfaktantů a lyofilizovány pro další použití. Touto metodou se obvykle připravují nanočástice ve formě emulze olej ve vodě (o/v) anebo modifikací této metody se připravuje dvojitá emulze voda v oleji ve vodě (v/o/v). [2, 17]

Dvojitě emulzní odpařovací metoda

Dvojitě emulzní odpařovací metoda je jedinečná svou schopností enkapsulace obou lipofilních i hydrofilních léčiv za vzniku dvojité emulze, oproti ostatním metodám přípravy nanočástic, které umožňují enkapsulaci lipofilních účinných látek [17].

Postup homogenizace při přípravě dvojité emulze v/o/v je proveden ve dvou krocích. V prvním kroku homogenizace se nejdříve emulguje vnitřní vodná fáze obsahující ve vodě rozpustnou účinnou látku a organická lipofilní fáze s rozpuštěným polymerem či lipofilním léčivem za vzniku primární emulze (v/o). Primární emulze je následně dispergována ve vnější vodné fázi, která obsahuje odpovídající stabilizátor pro vznik dvojité emulze (v/o/v). Takto připravená dvojitá emulze je následována krokem odpaření organického rozpouštědla z organické fáze, během kterého dochází k solidifikaci polymeru a enkapsulace roztoku účinné látky. [17]

2.5 Mechanismy uvolňování léčiv z polymerních nanočástic

Mezi nejdůležitějšími vlastnostmi nanoformulací je jejich schopnost cíleného dodání léčiva do místa účinku s prodlouženým uvolňováním léčiva. Také proto je nezbytné porozumět mechanismům uvolňování účinné látky. Uvolňování léčiva lze popsat pomocí několika fyzikálně – chemických mechanismů: difuze, bobtnání, rozdělování a eroze (desorpce vazby léčiva z povrchu, difuze z polymerní matrice, difuze polymerní stěnou nanotobolky, bobtnání polymerní matrice, eroze matrice, kombinace procesu eroze a difuze). [4, 13, 21, 22]

Obecně míra uvolňování léčiva závisí na solubilitě, difuzi a biologické rozložitelnosti matrice nanočástice, také na enkapsulační efektivitě léčiva a na velikosti nanočástice. Míra uvolňování enkapsulovaného léčiva je ovlivněna několika faktory. Velikost částic hraje klíčovou roli. Větší částice mají menší iniciální uvolnění tzv. burst a delší dobu prodlouženého uvolňování oproti menším částicím, což je způsobeno menší plochou povrchu částic. Vyšší koncentrace enkapsulovaného léčiva v nanočástici způsobí větší počáteční burst a rychlejší uvolňování léčiva. Naopak k nižšímu iniciálnímu uvolnění léčiva tzv. burst efektu dochází u nanočástic s nízkou enkapsulací. Pomalejší či zcela chybějící burst efekt uvolnění léčiva a zpomalené uvolňování lěčiva lze pozorovat u nanočástic tvořených polymerem reagujícím s léčivou látkou např: PLGA s volnými COOH skupinami a proteiny [13].

Následující text popisuje základní mechanismy, které se podílejí na uvolňování léčiva z nanočástice viz. Obrázek 6.

Povrchová eroze: K povrchové erozi dochází, když nejprve degraduje povrch postupným zmenšováním matrix či obalu nanotobolky. Tento mechanismus je upřednostňován, protože se jedná z důvodu své předvídatelnosti a kontrolovatelnosti o prodloužené uvolňování léčiva [22, 23].

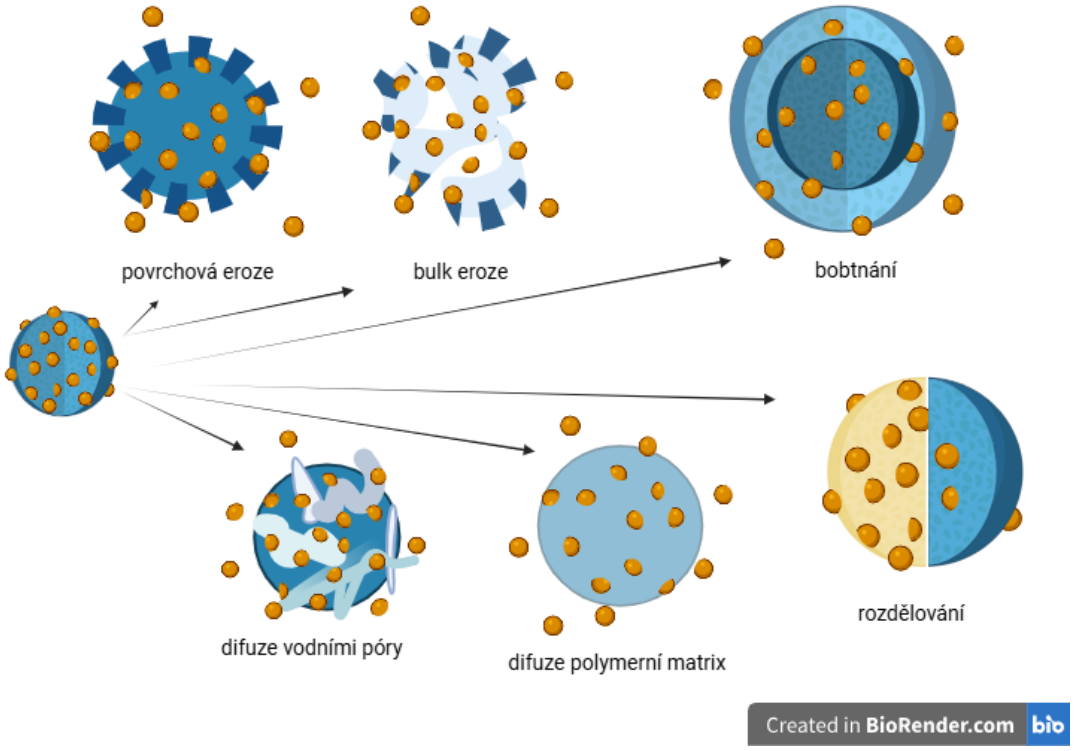
Objemová eroze (bulk erosion): Při hromadné erozi voda proniká do polymeru rychleji, než probíhá jeho eroze, během toho dochází ke zlomům v řetězcích polymeru. Nakonec to vyústí k homogenní degradaci celé matrix polymeru. Oproti povrchové erozi je hromadná eroze méně předvídatelná, netvoří ochranu před vnějším prostředím, a proto je i méně vhodná pro připravené nanočástice [22, 23].

Difuze vodními póry: Difuze léčiva vodní póry probíhá podle koncentračního gradientu. Rychlost uvolňování léčiva je ovlivněna difuzí přes síť vodních pórů vzniklých rozpuštěním rozpustné časti matrice, která je řízená vodními póry rozvinujících se struktur polymeru a jeho degradací, čímž usnadňují uvolňování léčiva [23].

Difuze polymerní matrix: Difuze polymerní matricí probíhá konstantní rychlostí. Je ovlivněna permeabilitou a tloušťkou polymeru. Během difuze nedochází k degradaci matrice nanočástice [22, 23].

Rozdělování: Mechanismus ovlivňující uvolňování léčiva do média pomocí rozdělování umožňuje transport léčiva nacházejícího se mezi dvěma nemísitelnými látkami např: polymery a hydrofobními oleji či fázemi jako je krev, voda. K proměření solubility léčiva ve dvou navzájem nemísitelných fázích se využívá tzv. rozdělovacího koeficientu. Pohyb léčiva z jedné fáze do druhé je závislý na relativním koncentračním gradientu, nebo chemickém potenciálu, a také na afinitě léčiva ke každé fázi. Uvolňování léčiva z nanočástice ve formě polymerní matrice či nanotobolky probíhá v případě hydrofobního léčiva, tak že hydrofobní léčivo zůstane delší dobu enkapsulavané v nanonosič [22, 24].

Bobtnání: K uvolňování léčiva bobtnáním dochází, když v polymerním nanonosiči obklopeném vodou začne postupně expandovat jeho síť, kdy během expanze polymeru vznikají chemické či fyzikální vazby. Pronikání vody do polymerního systému zvyšuje jeho tloušťku a objem, což umožňuje uvolňování léčiva. Míru bobtnání polymeru určuje jeho hydrofobicita a hustota příčných vazeb mezi jednotlivými řetězci polymeru. Mezi další faktory, které mohou ovlivnit bobtnání a míru uvolňování léčiva jsou zahrnuty teplota, pH, výběr vhodného polymeru a aditiva [22, 24].



Obrázek 6: Mechanismy uvolňování léčiv z NP (Created in https://BioRender.com)

2.6 Cílená distribuce nanočástic

Cílená distribuce nanočástic neboli targeting, umožňuje cílené uvolňování API v místě účinku, které vede ke zvýšení účinnosti léčiva, specifičnosti, snášenlivosti, terapeutického indexu a compliance pacienta, zatímco snižuje riziko toxicity a náklady na zdravotní péči [3, 5, 16].

Nanonosiče se používají pro léčbu nádorů a zánětlivých onemocnění za pomoci cíleného dodání léčiv do místa účinku prostřednictvím makrofágů, anebo nanočásticemi se specificky upraveným povrchem. [3]

Příkladem často používané cílené distribuce nanočástic je terapie nádorových onemocnění. Mezi primární terapeutické přístupy patří vedle operace a radioterapie taktéž konvenční chemoterapie, která je často nespecifická, a tím dochází k poškozování i zdravé tkáně, které vede k řadě nežádoucích vedlejších účinků. Nespecifičnost konvenčních chemoterapeutik vede k nevolnosti, neplodnosti, myelosupresi, imunosupresi, mukositidě anebo k tvorbě sekundárních metastáz. Cílená distribuce se taktéž využívá ke zvýšení limitované účinnosti léčiv z důvodu vrozených či získaných chemorezistenčních mechanismů např: získaná multi-drug rezistence (MDR) nádorových

buněk např: toxicita epirubicinu. Z důvodu toxicity protinádorových léčivých látek může dojít v některých případech k omezení jejich dlouhodobého podávání jako například u epirubicinu. Epirubicin, derivát antracyklinu, který je využíván k terapii hepatocelulárního karcinomu. Je jeho podávání omezeno z důvodu své kardiotoxicity. Dalšími důvody cíleného dodávání léčiv do místa účinku jsou ovlivnění biofarmaceutických vlastností léčiv a zlepšení jejich biologické dostupnosti. Toho se využívá při intravenózním podávání hydrofobních léčiv např: limitované podávání paklitaxelu, během jehož podávání může dojít k embolizaci z důvodu jeho agregace vlivem špatné rozpustnosti [25].

Schopnosti cíleného dodávání nanočástic jsou ovlivněny nejen jejich velikostí a povrchovými vlastnostmi, ale především i povrchovým nábojem a stupněm hydrofobicity polymerních nanočástic [21].

Cílené podávání léčiv se rozlišuje na aktivní a pasivní targeting [3, 5, 16].

2.6.1 Pasivní targeting

Pasivní targeting nanočástic s enkapsulovaným léčivem do cílového orgánu místa účinku probíhá na základě fyzikálně-chemických vlastností, tj. distribuci velikosti částic, povrchových vlastností – náboj, složení a stupeň hydrofobicity přenašeče bez účasti modifikace povrchu nanočástic dalšími specifickými cíli [3].

K pasivnímu targetingu dochází ve tkáních, které se vyznačují bohatším cévním zásobením se zvýšenou vaskulární permeabilitou zapříčiněnou necelistvým cévním zásobením s fenestracemi, a tam také cílí buněčná imunitní odpověď. Mezi tyto imunitní buňky se zahrnují makrofágy. Makrofágy se z důvodu volnější vaskularity shlukují v místech s patologickými změnami. Tyto patologické změny zvyšují permeabilitu, a tím umožňují prostup a akumulaci nanočástic. Zvýšenou permeabilitu patologicky změněných cév podporují uvolňované vazoaktivní látky jako např: bradykinin, oxid dusnatý (NO) a jeho oxidovaný produkt peroxynitrit. Dochází k efektu zvýšené permeability a retence (enhanced permeability and retention effect; EPR). K tomuto EPR efektu dochází v nádorových tkáních. Ke stejným jevům, zvýšené permeabilitě a EPR efektu, dochází v zánětlivých tkáních, ve kterých se nachází prozánětlivé mediátory jako např: prostaglandiny, vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor; VEGF) neboli vaskulární permeační faktor (vascular permeability factor; VPF) [3, 5, 26–28]. Příkladem je, že užití EPR efektu bylo prokázáno v chronickém zánětlivém

procesu kardiovaskulárního onemocnění aterosklerózy, během které endoteliální permeabilita cév umožňuje přenést nanočástice z lumen cév dovnitř do plaku aterosklerotického plátu pomocí monocytů a makrofágů [26]. Další možností využití pasivního targetingu nanočástic je, že makrofág se sám stane rezervoárem infekční agens [3].

EPR efekt zánětlivých tkání se liší na rozdíl od EPR efektu nádorových tkání pouze v jeho kratší době trvání retence nanočástic, protože zánětlivý otok se může díky lymfatickému systému rozptýlit do několika dnů. Na rozdíl od retence makromolekulárních či lipidických léčiv v nádorových tkáních, které zůstávají až po dobu několika týdnů [5, 27].

Ve studiích bylo prokázáno, že nanočástice s menší velikostí částic než 100 nm lze lokalizovat pomocí EPR efektu v místě nádoru, a to až s desetinásobně zvýšenou biologickou dostupností léčivé látky v nanonosiči v místě nádorové tkáně v porovnání s přímým podáním léčiva [26].

2.6.2 Aktivní targeting

Aktivního targetingu je dosaženo oproti pasivnímu targetingu pomocí funkčních modifikací povrchu nanočástic specifickými cíli – cílovými entitami jako například protilátkami či dalšími rozpoznávacími molekulami se selektivní afinitou k receptorům nebo epitopům na povrchu buněk cílového orgánu místa účinku [3, 16]. Nakonjugovaným ligandem na nanočástici může být protein (protilátka a její fragmenty), peptidy, nukleové kyseliny (aptamery), malé molekuly, vitamíny a polysacharidy. Výběr ligandu závisí na specifických vlastnostech cílového receptoru, tj. expresi receptoru, a také cílové tkáni, obvykle se jedná o tkáň s nádorovými buňkami [3, 16, 29].

Prodloužená doba cirkulace nanočásticového systému dodávání léčiv umožňuje efektivnější přenos nanočástic do nádorové tkáně pomocí EPR efektu a nakonjugovaná cílová struktura (ligand) zvyšuje její začlenění do cílových buněk endocytózou nanočástice a následné uvolnění léčivé látky. [30]

Cílená distribuce léčiv ať už pasivním nebo aktivním způsobem se využívá v celé řadě onemocnění zejména ze spektra nádorových onemocnění a chronických zánětů. Nicméně existuje i celá řada komplikovaných infekčních onemocnění, kdy je léčba komplikována např. dormantním stavem patogenu nebo jeho problematickou lokalizací (např. intracelulárně), kde mají cílené formulace také svůj potenciál.

2.7 Infekční onemocnění

Infekční onemocnění jsou způsobeny patogeny, mezi které řadíme viry, bakterie, houby a parazity, WHO je zařadila mezi celosvětově druhou nejčastější příčinu úmrtí. Mnoho patogenů může způsobovat akutní infekční onemocnění, která jsou účinně odstraněna imunitním systémem hostitele, ale podkategorie těchto patogenů, kterými jsou intracelulární patogeny, může zapříčinit perzistující a někdy až celoživotní infekce [31].

Chronické infekce jsou spojovány s biofilmem a intracelulárními bakteriemi, které jsou charakteristické především svou náročností jejich eradikace z důvodu vrozené rezistence k antibiotikům a hostitelské imunitní obraně. Biofilmy jsou druhem bakteriální populace složené z bakteriálních buněk a bakteriální extracelulární hydratované matrix, která může být spojena s povrchem tkání a orgánů organismů nebo některých inertních materiálů [32]. Některé intracelulární patogeny vlivem evoluce zvládnou uniknout hostitelskému imunitnímu systému a jsou schopné replikace uvnitř hostitelských buněk primárních makrofágů [31]. Intracelulárními patogeny způsobené perzistující infekce jsou fylogeneticky odlišné a zahrnují také jiné strategie překonání imunitního systému, přesto patogeny sdílí typově specifické mechanismy při interakci mezi patogenem a hostitelem uvnitř buňky [31].

Intracelulární bakterie jsou rozděleny na primární (obligátní) a podmíněné (fakultativní, oportunní) [33]. Intracelulární bakteriální infekce se podílejí na mnoha závažných klinických onemocněních, které zahrnují brucelózu, tularémii, shigelózu listeriózu, salmonelózu atd. [32]. Napříč antibiotickými skupinami jsou více než dvě třetiny antibiotik neúčinné pro terapii proti intracelulárním patogenům [32].

2.7.1 Vybrané intracelulární patogeny

Brucelóza patří mezi jednu ze světově nejrozšířenějších zoonóz. Toto infekční onemocnění je způsobené bakterií rodu *Brucella*. Druhy, které jsou fakultativními intracelulárními patogeny jsou lokalizované především v buňkách a orgánech MFS jako jsou např: makrofágy jater a sleziny. Lidská brucelóza, jejíž nejvíce virulentním druhem rodu *Brucella* u lidí je *Brucella melitensis*, se obvykle projevuje febrilním onemocněním, které může přetrvávat a rozvinout se do chronické formy onemocnění se závažnými komplikacemi. Rozvoj chronické infekce plyne ze schopnosti patogenu přežívat uvnitř fagocytujících buněk, což vede k selhání eliminace mikroorganismu a zároveň se tyto buňky stanou rezervoárem bakterie. I když lidská brucelóza spadá pod hlášená

onemocnění stále se vyskytují případy brucelózy, které jsou nediagnostikované anebo nehlášené, a proto pokračující onemocnění zůstává zdravotním rizikem. Toto onemocnění je zároveň také rozpoznáno jako jedna z nejčastějších nákaz u pracovníků v laboratořích manipulující s těmito patogeny a pro svou schopnost přenosu vzduchem a nízkou infekční dávku je brucelóza považována za potenciální biologickou zbraň pro možné zneužití k bioterorismu. Současně se svou patogenitou je terapie a klinické zvládnutí lidské brucelózy obtížná [34–36].

Tularémie je zoonózou, kterou způsobuje nákaza Gram negativní (G –) bakterií *Francisella tularensis*. Tularémie u lidí se vyskytuje v šesti různých klinických formách tohoto onemocnění v závislosti na cestě přenosu, vstupu bakterie do organismu, v rozmezí od život ohrožující pneumonie po méně závažnou ulceroglandulární tularémii. Na začátku onemocnění se projevují nespecifické příznaky zahrnující také flu-like syndrom s projevy horečky, bolestmi hlavy, kloubů a svalů. V pozdější fázi onemocnění dochází k rozvinutí jedné či více chronických lymfadenopatií, které se mohou rozvinout v lymfatickém systému na místě vstupu bakterie. Rozdílné kmeny s odlišným geografickým rozšířením vykazují odlišné hladiny virulence. *F. tularensis* je intracelulární bakterie, která se replikuje především v cytosolu fagocytujících buněk. Ačkoliv je tularémie primárně přírodní infekcí z důvodu své nízké infekční dávky po krátkou dobu a možnosti přenosu pouhým aerosolem je označená za možnou biologickou zbraň, která by mohla být zneužita v bioterorismu. [37]

Obecně průjmová onemocnění jsou hlavním globálním zdravotním problémem. Této zátěži jsou vystaveny zejména země s nízkým až středním příjmem v Asii a Africe, kde není snadný přístup k čisté vodě, sanitaci, dobré nutrici spolu se zdravotní péčí [38]. Bakterie rodu *Shigella* jsou jedním z převládajících bakteriálních původců průjmových onemocnění na celém světě. [38]

Shigelóza, bacilární úplavice, je vysoce nakažlivé průjmové onemocnění, jejímž původcem jsou fakultativně anaerobní, G – bakterie rodu *Shigella*, která se dělí na čtyři druhy: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* a *S. boydii* dělící se do dalších sérotypů. Všechny druhy bakterie *Shigella* v nízkých infekčních dávkách způsobují průjmová onemocnění. Nejčastějším způsobem přenosu onemocnění z člověka na člověka je fekálně – orální cesta nákazy, dále se může šířit nakaženou vodou, jídlem a povrchy. Bakterie rodu *Shigella* postihuje velkou část epitelu střev, kde v distálním konci střev prostupuje do mukózní vrstvy a tam dochází k její replikaci a šíření prostřednictvím

indukce cytoskeletálního přeskupení. Inkubační doba infekce se obvykle pohybuje mezi 1–4 dny, výjimkou je nákaza *S. dysenteriae* typu 1 s inkubační dobou trvající i do 8 dnů. Mezi prvními příznaky shigelózy se projevují horečka, bolest hlavy, malátnost, nechutenství a zvracení, a potom po několika hodinách dochází k propuknutí vodnatého průjmu. U většiny jinak zdravých jedinců nedochází ke zhoršení stavu a po několika dnech symptomy bacilární úplavice ustanou. Avšak u rizikových skupin pacientů, mezi které patří zejména novorozenci a malé děti od 1 do 4 let, se shigelóza obvykle rozvine v závažný vodnatý průjem někdy až i do průjmu s příměsí krve či hlenu. Infekce bakterií rodu *Shigella* může způsobit střevní i extraintestinální komplikace, mezi které se řadí i encefalopatie anebo se může dojít k rozvinutí i post – infekční manifestaci onemocnění např: syndrom dráždivého tračníku, reaktivní artritida, hemolyticko uremický syndrom či malnutrice. [38, 39]

Pseudomonas aeruginosa je G – oportunní bakterie, která může způsobovat závažné život ohrožující infekce. Je jednou z nejčastějších bakterií způsobující u imunokompromitovaných pacientů nosokomiální infekce např: pneumonie ventilovaných pacientů, chronické pneumonie pacientů s cystickou fibrózou či jedinců podstupující chemoterapie, infekce krevního řečiště, močových cest či popálenin [40].
P. aeruginosa je extracelulární patogen, který je schopný si osvojit nitrobuněčný způsob života intracelulární fází, během které naruší fagocytické funkce hostitele. Tato bakterie známá svou perzistencí je schopná vytvářet biofilmy, které jsou odolné proti enviromentálním stresům a fagocytóze, a také proto je používaná jako modelový organismus pro zkoumání biofilmů. Z důvodu své přirozené a získávané antibiotické rezistenci lze pozorovat omezenou účinnost antibiotik. Z důvodu zvyšující se prevalenci MDR (multi-drug rezistentní) *P. aeruginosa* kmenům se vyvíjí nové anti-biofilm látky. [32, 40–44]

2.7.2 Strategie intracelulárního přežití bakterií

Fyziologická imunitní obrana hostitele je zajišťována pomocí rozeznávání, opsonizace, fagocytózy a rozložením patogenů ve fagolysozomech, na kterém se podílí i produkce ROS a RNS (reaktivních forem kyslíku a dusíku) a apoptóza [1, 31, 33, 45]. Proti tomu intracelulární patogeny využívají rozdílné mechanismy, kterými obchází imunitní odpověď, a tím jsou schopné vyhnout se eliminaci imunitním systémem hostitele. [31]

Tyto strategie perzistujících mikroorganismů jsou širokým tématem, a proto vyzdvihnu klíčové mechanismy rezistence vybraných patogenů.

Bakterie rodu *Brucella* jsou schopné prostřednictvím svých virulenčních faktorů přežití a replikace v makrofázích. Virulence *Brucella spp.* většinou spočívá ve schopnosti vstupu, přežití a replikace ve fagocytujících i nefagocytujících buňkách, mezi kterými jsou hlavním cílem makrofágy. I když většina bakterií rodu *Brucella*, které vstoupí do makrofágů jsou ihned na začátku infekce odstraněny enzymy, volnými radikály kyslíku a oxidu dusnatého NO, tak průměrně 10 % bakterie *Brucella* je schopno přežití a proliferace uvnitř makrofágů prostřednictvím inhibice fúze fagosomu s lysozomem. Dochází k zastavení dozrání fagolysozomu a zároveň kyselé prostředí fagosomu stimuluje intracelulární replikaci bakterie. [31, 33, 46, 47]

Kritickým aspektem při výběru antibiotik k eradikaci intracelulárních bakterií je zvážení jejich umístění uvnitř buněk hostitele, které jim poskytují ochranu. [48]. Bakterie *Francisella spp.* může být pohlcena makrofágy, dendritickými buňkami a ostatními fagocytujícími buňkami, mezi které patří také hepatocyty, epiteliální buňky alveolů plic a červené krvinky, které by se mohly stát dalšími reservoáry během pozdější fáze infekce. Jejím mechanismem rezistence je překonání fagocytózy. Bakterie je schopná uniknout z fagosomu do cytosolu buňky, ve kterém následně dochází k její replikaci. Po intracelulární replikaci bakterie dochází k indukci apoptózy a následně dochází k eferocytóze, a tím i přenosu infekce do dalších buněk. [37, 48]

Bakterie *Shigella spp*. fagocytované makrofágy překonávají fagocytózu únikem z fagosomu a zároveň jsou schopné vyvolat pyroptózu makrofágu. Lýzou fagosomu se bakterie uvolní do cytoplazmy, kde se replikují, a potom se intracelulárně rozšíří do přilehlých epiteliálních buněk. Pyroptózou makrofágu dochází k šíření zánětlivých odpovědí, uvolnění endotoxinů, a tím vyvolávají lokální zánět a zároveň dochází k poškození přilehlých tkání. [38, 49–51]

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se vyznačuje svou schopností tvorby biofilmů, které jsou závislé na produkci exopolysacharidů. Během infekcí dýchacích cest způsobených chronickou kolonizací a tvorbou biofilmu bakterie, dochází k přeměně *P. aeruginosa* v mukoidní fenotyp, který se projevuje tvorbou exopolysacharidu alginátu. Primárním důvodem přetrvávání chronické infekce *P. aeruginosa* je potlačení

vychytávání alveolárními makrofágy, a proto jejím mechanismem rezistence je inhibice pohlcení fagocyty. [43, 52–54]

2.8 Terapeutické přístupy k eradikaci intracelulárních patogenů

Současná doporučení konvenčních terapií výše zmíněných onemocnění zahrnují následující postupy léčby.

Současná terapie lidské **brucelózy** vyžaduje použití kombinace antibiotik po dlouhou dobu. WHO směrnice doporučují kombinaci doxycyklinu a rifampicinu po dobu 6 týdnů, avšak nedávná doporučení navrhují léčbu doxycyklinem po dobu 6 týdnů současně podávané s aminoglykosidickými antibiotiky streptomycinem po dobu 2–3 týdnů, nebo gentamicinem po dobu 1 týdne. Současné terapeutické režimy často selhávají v eradikaci infekce s možností relapsu okolo 5 až 10 %, a to navzdory obstojné účinnosti těchto léčebných režimů. Kombinovaná terapie je více účinná než individuální, ale nové terapeutické přístupy jsou nezbytné z důvodů obtížnosti adherence pacienta k léčbě jako takové spolu s vedlejšími účinky kombinované terapie antibiotiky a riziky antibiotické rezistence [34].

Současná doporučení terapie **tularémie** se zakládají na zvládnutí akutních projevů infekce. Hlavním faktorem ve zlepšení prognózy pacientů s tularémií je včasné podání vhodné terapie, které vyžaduje lepší diagnostické a léčebné strategie [55].
Vzhledem k dlouhé inkubační době tularémie, 3-5 dní, je podstatné zahájit léčbu ihned po výskytu prvních příznaků. Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí a WHO vypracovali téměř stejná následující souhrnná doporučení léčby tularémie. Streptomycin a gentamicin jsou preferovanými antibiotiky pro léčbu všech kategorií pacientů – dospělí, děti a těhotné ženy, zatímco doxycyklin, chloramfenikol a ciprofloxacin jsou alternativními volbami terapie pro dospělé a děti. [56]. Streptomycin a gentamicin jsou preferovanými antibiotiky pro léčbu závažných infekcí z důvodu své baktericidní aktivity, která snižuje míru rizika relapsu [56]. Fluorochinolony a doxycyklin se využívají k léčbě méně závažných infekcí [55]. Avšak v literatuře popsaná antibiotická léčba je vysoce variabilní ve svém složení a době podání, závisí na klinické manifestaci tularémie, věku a zdravotnímu stavu pacienta, přítomnosti komplikací, poddruhu infekční agens a vývoji onemocnění [55, 56].

Z důvodu zvyšující se hrozby přenosu infekce **shigelózy** v rizikových skupinách, do kterých patří podvyživení, malé děti, staří a imunokompromitovaní jedinci a vyššího rizika šíření MDR kmenů bakterie rodu *Shigella*, které je podpořené cestováním napříč kontinenty, je vhodné použít požadovanou antimikrobní léčbu. Užití antibiotické terapie je doporučené z důvodů zkrácení doby trvání horečky a průjmu, přerušení šíření patogenu, a tím zamezení dalšího přenosu infekce. Perorálně podávaný ciprofloxacin a azitromycin jsou obecně považované za první linii terapie shigelózy u dospělých a dětí. Parenterálně podávaný ceftriaxon je doporučený pro léčbu závažných případů infekce a imunokompromitovaných pacientů. WHO doporučila jako první volbu léčby dospělých a dětí s bacilární dysentérií ciprofloxacin a jako druhou volbu terapie jsou považovány antibiotika azitromycin, cefixim a ceftriaxon. Mezi další druhou volbu terapie navrhla WHO trimetoprim-sulfamethoxazol, jakkoli je známá široce rozšířená rezistence k této kombinaci. Následující léčiva, kterými jsou kyselina nalidixová, ampicilin, pivmecillinam jsou považována za účinná, avšak nejsou doporučována, pokud není známa jejich citlivost k bakterii. Obecně vzhledem k MDR kmenům *Shigelly* je základem úspěšné terapie určení citlivosti antibiotik. Pro doplňkovou terapii zkrácení doby trvání průjmu je doporučeno podávání *per os* zinku či probiotik *Saccharomyces boulardii* a *Lactobacillus rhamnosus* GG [38, 39, 49].

Z důvodu zvyšujícího se rizika MDR rezistentních kmenů ***P. aeruginosa*** je nutné včasné podání vhodně zvolené léčby, která obvykle zahrnuje v počáteční fázi podávání kombinace dvou antibiotik s antipeudomonadovou aktivitou, které působí odlišnými mechanismy účinku. Kombinovaná terapie obvykle zahrnuje podávání β-laktamového ATB (piperacilin-tazobactam, imipenem, meropenem, cefepim, ceftazidim, aztreonam) s aminoglykosidy (tobramycin, amikacin, gentamicin) či fluorochinolony (levofloxacin, ciprofloxacin). V případě nízkéhoho rizika výskytu MDR po zjištění citlivosti *P. aeruginosa* k antibiotikům, je doporučené monoterapeutické použití ATB. Pro monoterapii je doporučené podávání uzkospektrého ATB např: ceftriaxon, ertapenem, nebo levofloxacin. [57–59]

Nynější léčba infekcí způsobených intracelulárními bakteriemi čelí mnoha úskalím. Prvním bodem je ten fakt, že se u těchto bakterií vyskytují získané genetické mutace, které umožňují bakteriím různými mechanismy unikat eliminaci buňkami imunitního systému hostitele, tj. fenotypová rezistence [33]. Kritickým aspektem při výběru antibiotik k eradikaci nitrobuněčných bakterií je zvážení jejich ochranných

účinků intracelulární lokalizace [48]. Další záležitostí důležitou ke zvážení je problém vzrůstající antibiotické rezistence, která znesnadňuje podaní antibiotik pro odstranění nitrobuněčných bakterií [33]. Z těchto důvodů a omezeného množství antibiotik je zapotřebí nalézt nové terapeutické přístupy zahrnující vývoj nových léčiv, nebo nových cest využití již existujících léčiv. [56]

Nanotechnologie ukazuje slibný přístup léčby intracelulárních infekcí, protože tyto nové terapeutické přístupy umožňují cílené podávání léčiv do makrofágů, které fungují jako rezervoáry infekční agens ať už virových – HIV virus, parazitárních např: rod *Leishmania*, nebo bakteriálních např: *Mycobacterium tuberculosis* a prodloužené uvolňování enkapsulovaných léčiv uvnitř infikovaných buněk [3, 16, 34, 60].

Mezi nové přístupy terapie a zároveň pro snížení tlaku na používaní antibiotik jsou pro léčbu **shigelózy** ve vývoji rekombinantní probiotika se zacílením na specifické patogeny, fágová terapie, organické kyseliny, nanočástice s CuO a pro prevenci se vyvíjí shigella vakcíny, kdy některé z nich jsou již klinicky testovány. [33, 39, 49, 61]

Pro terapii **brucelózy** jsou studovány drug delivery systemy (DDS), ve kterých během experimentů byly již úspěšně vyzkoušeny PLGA mikro a nano – částice obsahující enkapsulovaný gentamicin [34, 35, 62, 63], dále pevné lipidické nanočástice (SLN) s enkapsulovaným doxycyklinem a rifampicinem [33]. V další studii byla zkoumána formulace chitosanem modifikovaných PLGA nanočástic s enkapsulovaným gentamicinem pro možné *per os* podání tohoto antibiotika. [64]

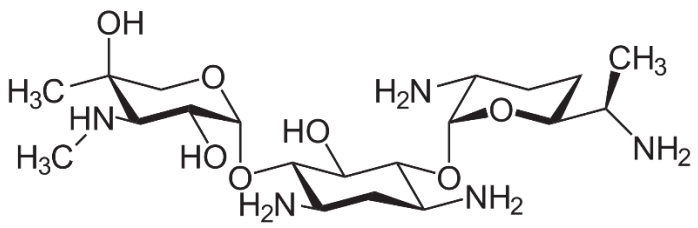
Pro léčbu **tularémie** se zkouší použití chemoterapie a imunoterapie, a to specifické enzymy, nebo antimikrobní peptidy. [56] V experimentálních modelech byly úspěšně použité liposomální gentamicin pro terapii infekcí způsobených bakteriemi *F. tularensis*, *Brucella spp.* [65].

K léčbě ***P. aeruginosa*** byly zkoumány PLGA nanočástice s enkapsulovaným gentamicinem, SLN nanočástice s amikacinem a proanthocyanidin-chitosanové nanočástice s enkapsulovaným gentamicinem [41, 60, 66, 67].

Fosfatidylcholin-chitosanové nanočástice s adsorbovaným gentamicinem na jejich povrchu byly úspěšně vyzkoušené pro eradikační terapii biofilmů a intracelulárních bakterií, kdy gentamicin je možné účinně dopravit do struktury biofilmu z důvodu dobré kompatibility nanostruktur a fosfolipidů a snadné fagocytózy buňkami. Navíc tyto lékové formy mohou umožnit snížení podávané dávky gentamicinu a rozšířit možnosti aplikace

antibiotik, což může v budoucnosti zajistit alternativní možnosti léčby závažných bakteriálních infekcí. [32]

Gentamicin je široce používané aminoglykosidické ATB, které je účinné zejména proti aerobním G – bakteriím, a proto se používá k léčbě těžkých až závažných infekcí. Struktura aminoglykosidů se skládá z hexózového jádra, na které jsou připojeny glykosidickými vazbami dva či více aminocukrů. Základním mechanismem účinku je inhibice bakteriální proteosyntézy z důvodu ireverzibilní vazby na 30S podjednotku ribozomu, což má za následek baktericidní účinek ATB. Aminoglykosidová ATB se obecně podávají parenterálně z důvodu své špatné gastrointestinální absorpce, a to tedy nejčastěji v intravenózních, intramuskulárních cestách podání či topických a v očních přípravcích. Gentamicin je hydrofilní, polykationický ve fyziologickém pH a špatně prostupuje přes membrány do buněk. Zatímco gentamicin zůstává základní volbou pro léčbu G negativních (G−) bakteriálních infektů, jeho klinické použití je omezené z důvodu potenciálních nežádoucích účinků aminoglykosidových ATB, které zahrnují nefrotoxicitu, ototoxicitu a neuromuskulární blokádu. Z těchto důvodů je důležité bezpečné dávkování a důsledný monitoring pro dosažení maximalizace účinků a minimalizace rizik. Aminoglykosidy jsou významné pro svůj koncentračně závislý baktericidní účinek, který koreluje s vyššími sérovými hladinami ATB. Z této příčiny jsou upřednostňované prodloužené intervaly dávkových režimů, tj. podání v jedné dávce za den z důvodu maximalizace baktericidní aktivity a minimalizace toxicity. Další důležitou vlastností je jejich post-antibiotický účinek, který vede ke kontinuálnímu potlačování bakteriálního růstu i potom, když dojde ke snížení antibiotické koncentrace pod minimální inhibiční koncentraci (MIC). A proto tento prodloužený post-antibiotický efekt nadále, také podporuje podávání vyšších dávek v prodloužených intervalech, jak to umožňuje efektivní baktericidní účinek při malém počtu dávek. [64, 65, 68–71]



Obrázek 7: Vzorec gentamicinu (ChemDraw)

S ohledem na uvedené limitace gentamicinu je jeho použití v terapii bakterióz komplikované a terapie nemá vždy požadovaný efekt. Jednou z možností, jak zlepšit

terapeutický profil gentamicinu je jeho enkapsulace do vhodného biokompatibilního nano-nosiče, který zajistí distribuci do infikovaných makrofágů.

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit nanočástice založené na PLGA jako nosič pro antibiotikum schopné zasáhnout obligátní intracelulární bakterie, schopné přežívat v makrofázích. K zacílení do makrofágů jsou optimální parametry nanočástic průměrná velikost 100–300 nm, nízké PDI, negativní zeta potenciál a sférický tvar. Jako léčivo volby byl zvolen gentamicin, který je považován za zlatý standard v terapii intracelulárních bakterióz. Cílem práce bylo připravit nanočástice s co nejvyšší enkapsulační efektivitou a s maximálním drug-loadem.

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje

- Analytické váhy Kern, max 220 g, d = 0,0001 g
- Váhy Kern 440-35N (Kren, Balingen, Německo), max 400 g, d = 0,01 g
- Magnetická míchačka IKA-WERKE RT 5 power, (IKA, Staufen, Německo) 100–1000 otáček/min
- Mini Vortexer (Heathrow Scientific, USA)
- Ultrazvuková sonda Microspitze MS73 (Bandelin Electronic, Německo)
- Ultrazvuková sonda Diax 900 Heidolph, 8000–26000 ot. / min., 6 pásem
- Multifunkční chlazená centrifuga MPW 260R, MPW Medical Instruments (Varšava, Polsko)
- Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK)
- Pipety Finnpipette F2, Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hi 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Woon socket, Rhode Island, USA)
- Spektrofotometr Specord 205, Analytik Jena (Jena, Německo)
- Třepací vodní lázeň GFL 1083, GFL (Burgwedel, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin electronic, Německo)
- HPLC systém

4.2 Použité suroviny

- PLGA 50:50 Purasorb® PDLG 5002A (Corbion, Amsterdam, Holandsko)
- Poloxamer 407 - Pluronic® F-127 (Sigma Aldrich, Německo)
- Gentamicin sulfát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Trehalosa (Merck, Praha, ČR)
- Acetonitril (ACN) (Penta, Chrudim, ČR)
- Chloroform (CCl_3)
- Dichlormethan (DCM)
- Čištěná voda (připravená reverzní osmózou, FaF UK)
- Polyvinylalkohol (PVA) (Merck, Praha, ČR)

- Fosfátový pufr (phosphate buffer saline; PBS) (Merck, Praha, ČR)
- Borátový pufr
- Glycin (Merck, Darmstadt, Německo)
- Fmoc-Cl (9-fluorenylmetyl chloroformát)
- Hydroxid draselný
- Mobilní fáze (MF) - kyselina mravenčí HPLC grade (Merck, Darmstadt, Německo)
- MF – methanol

4.3 Metody

4.3.1 Příprava NP – dvojitě emulzní odpařovací metoda

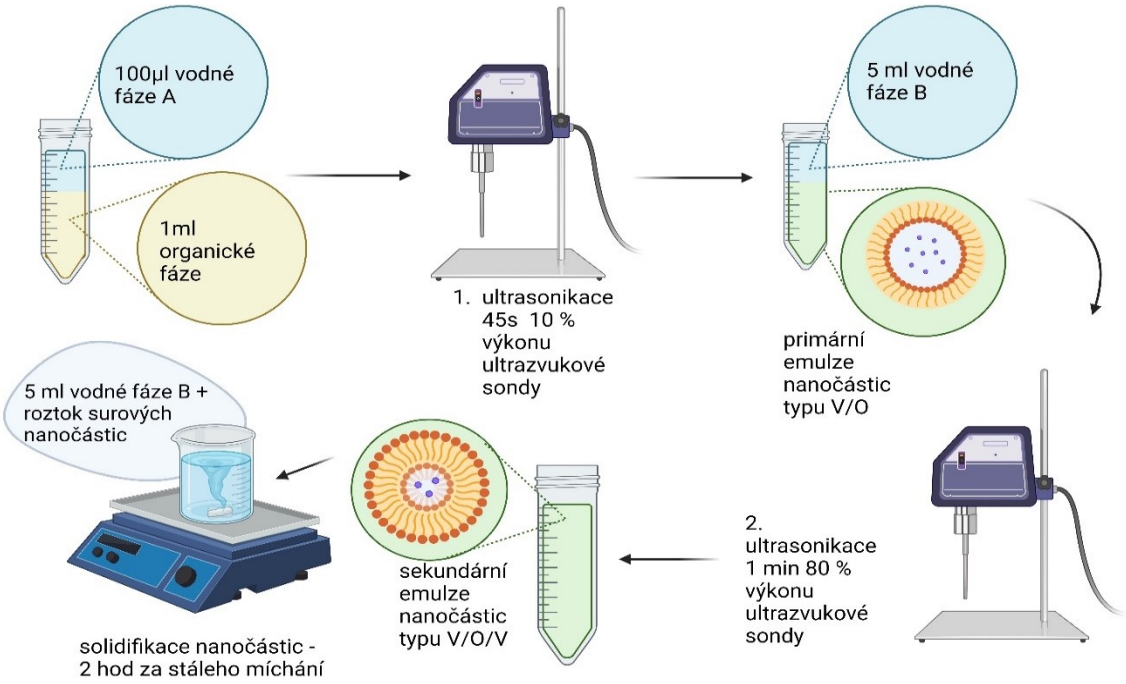
***Příprava vodné fáze A**:* Roztok vodné fáze s gentamicin sulfátem o koncentraci 80 mg/ml, byl připraven navážením a rozpuštěním gentamicin sulfátu v roztoku fosfátového pufru (PBS) nebo čištěné vody. Pro přípravu 200ml PBS pufru byla použita jeho tableta. Tableta byla rozpuštěna v 200 ml čištěné vody za laboratorní teploty a stálého míchání na magnetické míchačce.

***Příprava organické fáze**:* Do skleněné lékovky bylo naváženo potřebné množství polymeru PLGA Purasorb® PDLG 5002A pro vznik výsledné koncentrace 50 mg/ml, které bylo následně rozpuštěné v potřebném množství organického rozpouštědla – chloroformu (CCl_3), dichlormethanu (DCM) či ethylacetátu (EtAc).

***Příprava vodné fáze B**:* Pro přípravu vodné fáze B bylo potřeba navážit příslušné množství povrchově aktivní látky, které bylo rozpuštěno v čištěné vodě. PVA, Pluronic® F-127 v různých koncentracích – 3%, 1%, 0,5% PVA a 0,1% a 0,5% Pluronic® F-127 byly použity jako povrchově aktivní látky pro stabilizaci vznikajících nanočástic. PVA bylo rozpuštěno za zvýšené teploty a stálého míchání na magnetické míchačce. Takto byl připraven zásobní roztok s nejvyšší používanou koncentrací – 3% PVA a 0,5% Pluronic® F-127 a následným ředěním byly připraveny zbylé potřebné koncentrace vodné fáze B.

4.3.2 Proces přípravy nanočástic

Pro přípravu nanočástic byla použita dvojitě emulzní odpařovací metoda: Do plastové centrifugační 50ml zkumavky byl napipetován 1 ml organické fáze, ke kterému bylo přidáno pipetou 100 µl vodné fáze A. Zkumavka byla umístěna do ledové lázně, která byla umístěna pod ultrazvukovou sondu. Pro vytvoření primární i sekundární emulze byla použita ultrazvuková sonda. Pro vytvoření primární emulze typu v/o byla použita ultrasonikace po dobu 45 sekund o výkonu přístroje 10 %. Poté bylo přidáno pomocí pipety 5 ml vodného roztoku B pro vytvoření sekundární emulze. Podruhé byla použita ultrazvuková sonikace po dobu 1 minuty o 80% výkonu přístroje. Vznikla emulze nanočástic typu v/o/v, která byla přidána k 5 ml vodné fáze B. Kádinka s 5 ml vodné fáze B byla již připravena na zapnuté magnetické míchačce. Po dobu minimálně 2 hod za stálého míchání (300 ot. /min) při laboratorní teplotě v digestoři došlo k úplnému odpaření organického rozpouštědla – CCl_3, DCM, EtAc v organické fázi. Po odpaření organického rozpouštědla, během procesu solidifikace, vznikla suspenze nanočástic.



Obrázek 8: Znázornění postupu přípravy polymerní nanočástic typu v/o/v (Created in https://BioRender.com)

4.3.3 Zpracování a uchování vzorků nanočástic

Vzniklá suspenze polymerních nanočástic byla napipetována do 2ml mikrozkumavek typu Eppendorf. Mikrozkumavky byly následně umístěny do centrifugy za podmínek 18000RPM při 21 °C po dobu 25 min, ve které došlo k oddělení supernatantu od sedimentu (polymerních nanočástic) na dně mikrozkumavky. Z mikrozkumavek byl následně opatrně odebrán pipetou supernatant, aniž by došlo k rozvíření sedimentu vzniklých nanočástic. Supernatant jednotlivých vzorků byl přepipetován do mikrozkumavek. Pro rozdispergování sedimentu vzorků určených k zamražení byl přidán 1 ml 5% threalosy, která slouží jako kryoprotektant a lyoprotektant. Mikrozkumavky s roztoky supernatantů a rozdispergovaných sedimentů byly uchovány k dalšímu použití při -20 °C.

4.3.4 Měření velikosti částic a indexu polydisperzity

K měření velikosti částic ve vzorcích byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS90. Stanovení velikosti částic na zetasizeru je založeno na dynamickém rozptylu světla (dynamic light scattering – DLS). [72, 73] Ze suspenze polymerních nanočástic byl odebrán objem 100 µl do plastové měrné kyvety, ke kterému byl napipetován 1 ml čištěné vody. Tímto způsobem připravený vzorek byl správně umístěn do Zetasizeru® Nano ZS90. Viskozita média byla nastavena jako viskozita čištěné vody. Vzorky byly proměřeny třikrát a každé měření zahrnovalo 12 nezávislých běhů. Intenzita rozptýleného světla byla měřena při úhlu rozptylu 173°. Proměřování každého vzorku probíhalo při teplotě 20 °C ± 0,5 °C.

4.3.5 Měření enkapsulační efektivity a drug – loading

Enkapsulační efektivita (encapsulation efficiency; EE) udává kolik procent z celkového použitého množství účinné látky gentamicin sulfátu bylo enkapsulováno do připravený polymerních nanočástic viz. Rovnice 1.

$$EE[\%] = \frac{\text{původní hmotnost} - \text{hmotnost v supernatantu}}{\text{původní hmotnost gentamicinu}} \times 100\% \text{[74]}$$

Rovnice 1: Výpočet enkapsulační efektivity

Kapacita naplnění léčivem (drug-loading capacity; DLC) udává jaké procentuální množství zaujímá enkapsulovaná účinná látka gentamicin sulfát v nanočásticích DDS. Vyjadřuje schopnost nosiče uzavřít v sobě účinnou látku viz. Rovnice 2.[74–76]

$$DLC[\%] = \frac{hmotnost\ enkapsulovaného\ gentamicinu}{celková\ hmotnost\ nanočástic} \times 100\%[74]$$

Rovnice 1: Výpočet drug- loading kapacity

Hodnocení bylo provedené nepřímým stanovením obsahu gentamicinu v nanočásticích ze supernatantu vzorků zbylého neenkapsulovaného gentamicinu po centrifugaci připravených nanočástic pomocí připravených kalibračních křivek. Výpočtem z kalibračních křivek se stanovuje reálná koncentrace zjišťovaného analytu v připravených vzorcích. Pro stanovení enkapsulační efektivity ve vzorku byla zapotřebí nejprve derivatizace supernatantu obsahující zbylý neenkapsulovaný gentamicin sulfát z důvodu absence chromoforu v molekule API. Byly vyzkoušeny dvě odlišné derivatizační reakce, jejímž cílem bylo zavedení chromoforu či fluoroforu (pro dva různé druhy měření nově zavedeného signálu chromoforu, nebo fluoroforu).

Příprava roztoků pro derivatizační reakci – metoda HPLC – FLD

Zásobní roztok gentamicin sulfátu 0,8 mg/ml: Pro připravení zásobního roztoku gentamicinu 0,8 mg/ml se naváží 8 mg gentamicin sulfátu, který je následně rozpuštěn v 10 ml čištěné vody.

Fmoc-Cl 2,5mM 0,65mg/ml v ACN: Derivatizační roztok Fmoc-Cl je připraven navážením 6,5 mg Fmoc-Cl, které se rozpustí v ACN.

Borátový pufr 0,2M pH=8,00: Borátový pufr je připraven navážením 0,62g H_3BO_3, která je rozpuštěna v 50 ml čištěné vody. Následně je upraveno pH borátového pufru pomocí 0,2M roztokem KOH.

Glycin 100,4 mM 7,54 mg/ml v H_2O: Roztok glycinu je připraven pomocí rozpuštění 75,4 mg v 10 ml čištěné vody.

Derivatizace vzorků supernatantů s gentamicinem – Fmoc-Cl

Z připravených vzorků supernatantů polymerních nanočástic v 2ml mikrozkumavkách typu Eppendorf byl odebrán 100µl vzorek do nové 2ml mikrozkumavky typu Eppendorf, ke kterému byl napipetován objem 450 µl ACN.

Poté byl vzorek míchán na vortexu po dobu 30 min při rychlosti otáčení 20000 RPM (G), kdy došlo ke sražení zbylého PVA v roztoku supernatantu. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 275 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 225 µl borátového pufru, a takto upravený vzorek byl následně podroben derivatizační reakci s Fmoc-Cl. Kdy byl nejdříve odebrán objem 50 µl z výše upraveného vzorku supernatantu gentamicin sulfátu, ke kterému bylo přidáno 450 µl roztoku borátového pufru/ACN (v/v, 1:1) a 500 µl Fmoc-Cl. Tento roztok byl po dobu 20 min při laboratorní teplotě míchán na vortexu při rychlosti otáčení 800 RPM.

Po uplynutí této doby bylo přidáno 25 µl roztoku glycinu, který slouží zastavení derivatizační reakce z důvodu vychytávání přebytečného množství Fmoc-Cl. Po přidání glycinu probíhalo po dobu 5 min opětovné míchání za laboratorní teploty na vortexu při 800 RPM. Ve vzorcích obsahujících PVA vznikla sraženina po přidání roztoku glycinu. Z tohoto důvodu byl vzorek centrifugován po dobu 10 min při rychlosti otáčení (12.0 RPM).

Následně bylo třeba vzorek naředit. Z takto připravené reakční směsi bylo odebráno 25 µl derivatizovaného vzorku, ke kterému bylo přidáno 975 µl 50% roztoku ACN. Poté byl vzorek po dobu 5 min centrifugován při rychlosti otáčení 12.0 RPM.

Tímto postupem derivatizovaný a naředěný vzorek byl přefiltrován pomocí filtrů Millex 0,22 µm. Poté bylo přefiltrováno 200 µl této reakční směsi do předem připraveného insertu a následně zanalyzováno měřením v HPLC-FLD. Pro zjištění EE gentamicin sulfátu byly naměřené výsledné hodnoty ploch peaků dosazeny do předem připravených rovnic kalibračních křivek viz. Grafy 1–5.

4.3.5.3 HPLC – FLD analýza experimentální podmínky

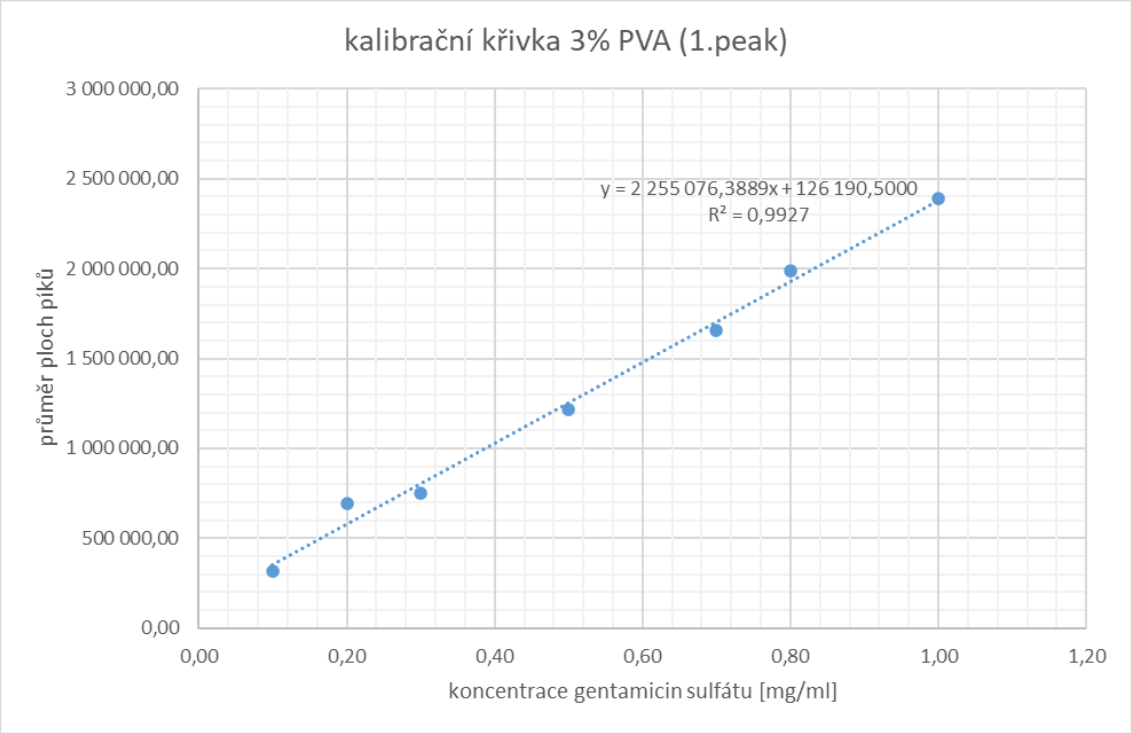
Chromatografické podmínky

K měření byly použité kolony jako stacionární fáze (SF) Security Guars C18 disc a Kinetex Polar C18 150×4,6mm 2,6µm. Teplota v kolonovém prostoru byla temperována na 30 °C. Mobilní fáze A (MF A) byla tvořená 0,1% kyselinou mravenčí a mobilní fáze B (MF B) obsahovala methanol. Pro analýzu byla využitá metoda izokratické eluce se složením mobilní fáze 93 % MF B a 7 % MF A (v/v). Nástřik analytů byl 5 µl (nebo 15 µl). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,0 ml/min a celková doba trvala 15,5 min s retenčními časy 10,37 min, 11,1 min, 11,5 min a 13,2 min.

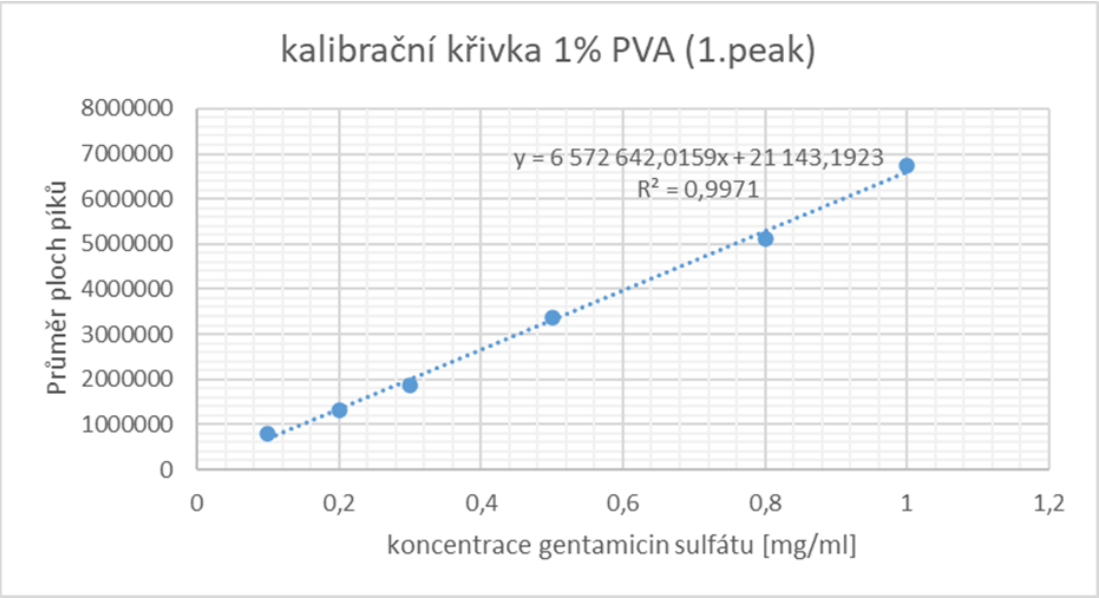
Připravené vzorky analytů derivatizační reakce byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru, který pracoval při vlnových délkách λ_{ex} = 260nm a λ_{em} = 315nm.

Příprava mobilních fází

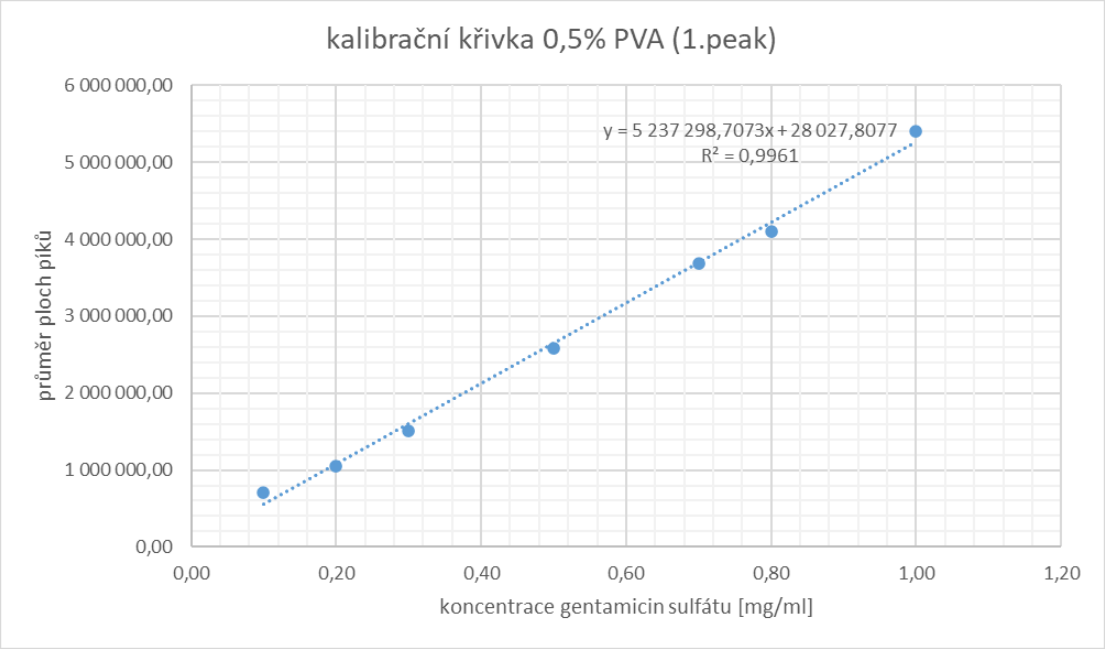
Před začátkem měření analytů na HPLC byli připraveny oba roztoky mobilních fází, a to 0,1% roztok kyseliny mravenčí a roztok methanolu do zásobních lahví MF.



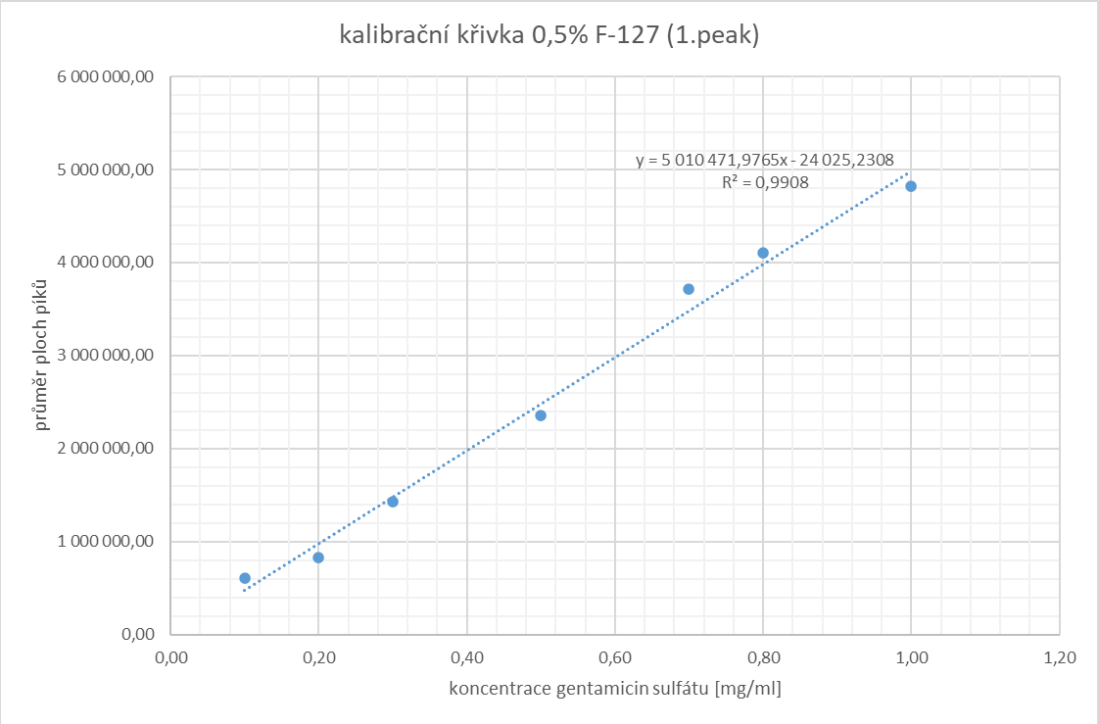
Graf 1: Kalibrační křivka 3% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC-FLD



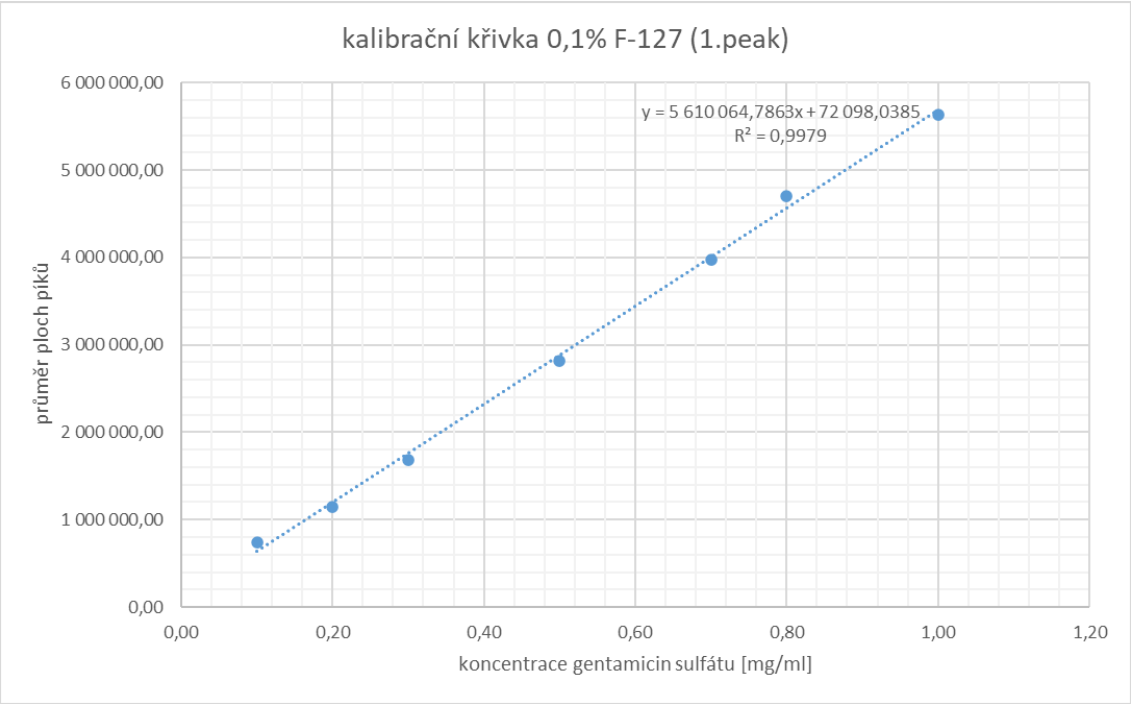
Graf 2: Kalibrační křivka 1% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD



Graf 3: Kalibrační křivka 0,5% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD



Graf 4: Kalibrační křivka 0,5% F-127 (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD



Graf 5: Kalibrační křivka 0,1% F-127 (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD

4.3.5.4 Spektrální analýza a derivatizace vzorků ninhydrinem

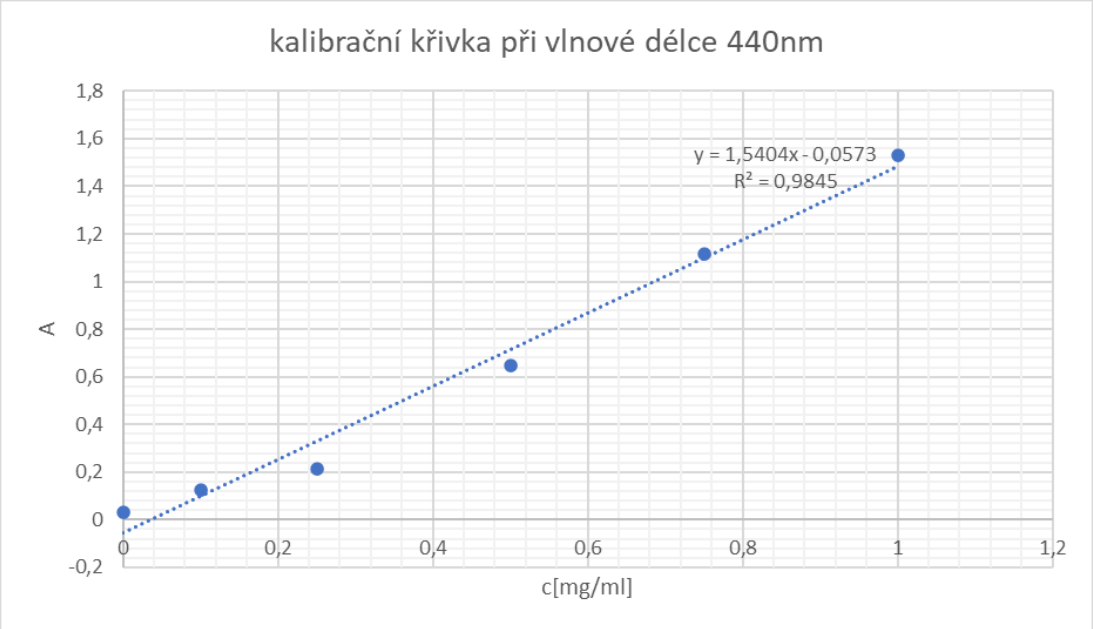
Pokus o stanovení EE metodou spektrofotometrie byl proveden ze supernatantů připravených vzorků NP. Nejdříve bylo zapotřebí zavést chromofor za pomoci derivatizační reakce s ninhydrinem.

Příprava roztoků pro derivatizační reakci spočívala v připravení 1,25% roztoku ninhydrinu a 2× krát koncentrovanějšího roztoku PBS. Derivatizační reakce vzorků supernatantů měla následovný postup.

Derivatizační reakce s ninhydrinem:

K 1 ml vzorku supernatantu byl přidán 1 ml 2× koncentrovanějšího roztoku PBS a 2 ml 1,25% roztoku ninhydrinu. Následně byla takto připravená reakční směs vložena do horkovzdušné sušičky vyhřáté na teplotu 95 °C po dobu 60 min. Reakci je nutné chránit před světlem z důvodu fotonestability ninhydrinu. Po uplynutí reakční doby optimalizované derivatizační ninhydrinové reakce byl vzorek zchlazen v předem připravené ledové lázni stíněné před světlem, která napomáhá k ukončení derivatizační reakce.

Tímto způsobem připravená reakční směs barevného roztoku byla spektrofotometricky proměřena v kyvetě z křemenného skla pro nepřímé stanovení obsahu enkapsulovaného gentamicin sulfátu. Měření probíhalo při vlnových délkách v rozmezí od 409 nm do 440 nm. Byla sestrojena kalibrační přímka Graf 6.



Graf 6: Kalibrační křivka gentamicin sulfátu derivatizovaného ninhydrinem pro spektrofotometrické měření při λ= 440nm

5 Výsledky a diskuse

V rámci praktické části byly připraveny polymerní nanočástice s enkapsulovaným gentamicin sulfátem pomocí dvojitě emulzní odpařovací metody. Zkoumal se vliv použitých organických rozpouštědel a surfaktantů na výsledné NP viz. Tabulka 1.

V další části experimentální práce proběhlo vyhodnocení množství enkapsulovaného antibiotika gentamicin sulfátu v nanočásticích pomocí nepřímého stanovení koncentrace v supernatantu odebraného po centrifugaci NP viz. Tabulka 1.

Tabulka 1: Vzorky PLGA 50:50 rozpuštěné v rozdílných organických rozpouštědlech. Naměřené hodnoty vzorků nanočástic – velikost, PDI, enkapsulační efektivita, DLC

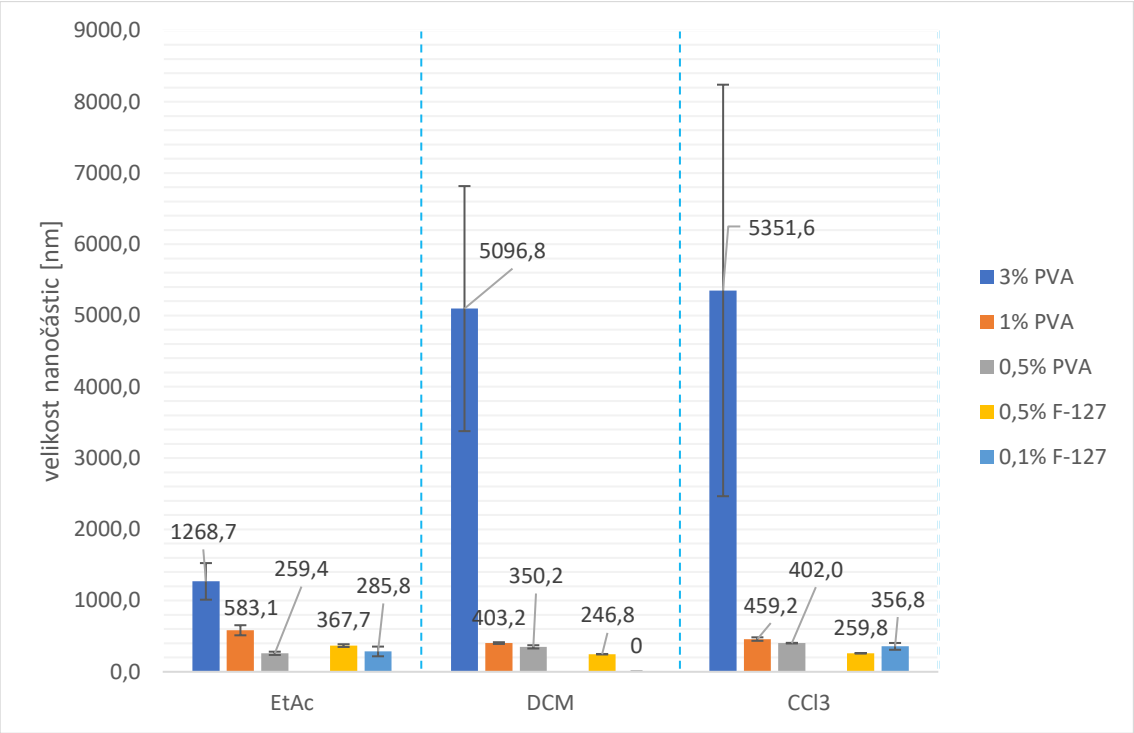
surfaktant	organické rozpouštědlo	velikost nanočástic [nm]	δ	PDI	δ	EE [%]	δ	DLC [%]	δ
3% PVA	EtAc	1268,7	256,8	0,513	0,180	14,0	4,0	0,36	0,104
	DCM	5096,8	1719,4	0,662	0,149	18,5	2,9	0,48	0,075
	CCl3	5351,6	2887,5	0,567	0,067	0	0	0	0
1% PVA	EtAc	583,1	70,8	0,485	0,087	23,9	2,6	0,62	0,068
	DCM	403,2	12,2	0,203	0,012	25,7	2,2	0,67	0,057
	CCl3	459,2	24,5	0,229	0,012	14,0	1,5	0,36	0,040
0,5% PVA	EtAc	259,4	22,8	0,068	0,068	12,9	0,4	0,34	0,010
	DCM	350,2	22,8	0,258	0,045	18,1	4,5	0,47	0,116
	CCl3	402,0	4,4	0,296	0,012	21,3	3,3	0,55	0,085
0,5% F-127	EtAc	367,7	19,2	0,549	0,022	14,7	0	0,38	0
	DCM	246,8	3,3	0,363	0,020	9,0	0	0,23	0
	CCl3	259,8	1,9	0,569	0,016	5,6	0	0,15	0
0,1% F-127	EtAc	285,8	68,1	0,445	0,149	19,0	0,3	0,49	0,008
	DCM	0	0	0	0	22,3	0,6	0,58	0,016
	CCl3	356,8	48,0	0,495	0,145	19,1	3,3	0,50	0,084

Byly vyzkoušeny dvě metody HPLC (Tabulka 1) a spektrofotometrie viz. (Tabulka 2).

Tabulka 2: Hodnoty vzorků derivatizované ninhydrinem pro proměření metodou spektrofotometrie

surfaktant	organické rozpouštědlo	X [mg/ml]; Kalibrační křivka – ninhydrin	EE (%)
0,5% F-127	EtAc	0,964	-20,5
	DCM	1,005	-25,6
	CCl3	0,939	-17,4
0,1% F-127	EtAc	0,981	-22,6
	DCM	1,081	-35,0
	CCl3	0,945	-18,1
3% PVA	EtAc	0,711	11,1
	DCM	0,589	26,3
	CCl3	0,650	21,9
1% PVA	EtAc	0,675	15,6
	DCM	0,581	27,4
	CCl3	0,624	22,0
0,5% PVA	EtAc	1,044	-30,5
	DCM	0,665	16,9
	CCl3	0,695	13,2

Z důvodu získání výsledků bez výpovědní hodnoty ze spektrofotometrického měření vzorků se zavedeným chromoforem ninhydrinu na gentamicin sulfát se upustilo od dalších pokusů derivatizační reakce s ninhydrinem (Tabulka 2). Možným řešením selhání derivatizační reakce pro zavedení chromoforu na API by mohla být pokračující optimalizace metody derivatizační reakce s ninhydrinem, a také eliminace lidské chyby. Nicméně HPLC metoda a derivatizace pomocí Fmoc-Cl byla v tomto ohledu spolehlivější. Z těchto důvodů se přešlo na zavedení fluoroforu na API (v supernatantu polymerních nanočástic) derivatizační reakcí s Fmoc-Cl pro zjištění množství enkapsulovaného gentamicin sulfátu ve výsledných vzorcích NP.

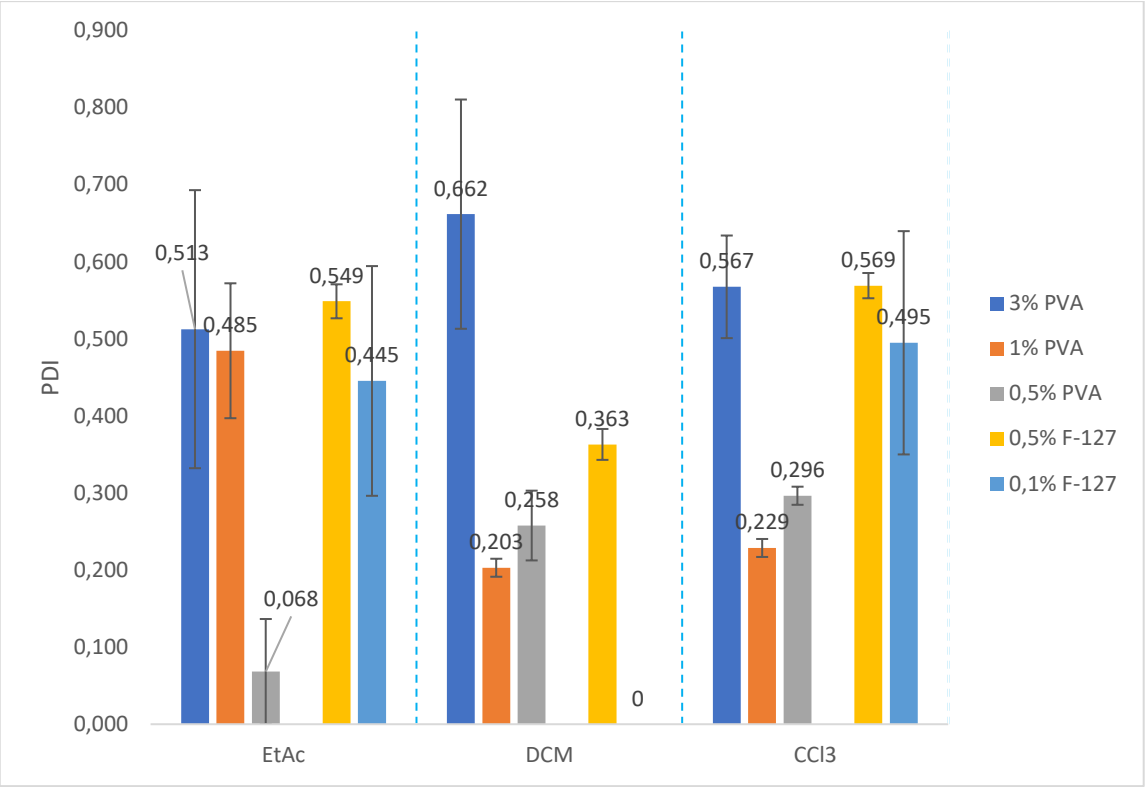


Graf 7: Závislost velikosti nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA

V grafu 7 jsou znázorněny hodnoty představující závislost velikosti nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA použitých při jejich přípravě. Z výsledků je patrné, že nejnižší velikosti nanočástic byly připravené za použití EtAc s 0,5% PVA, DCM s 0,5% F – 127 a CCl_3 s 0,5% F- 127. Hodnoty u vzorku sloupce DCM s 0,1% F-127 nebyly naměřeny z důvodu selhání přípravy nanočástic, při této kombinaci pomocných látek, se žádné částice nepodařilo získat. Během odpařování organického rozpouštědla při solidifikaci nanočástic v surfaktantu 0,1% F-127 s použitým organickým rozpouštědlem DCM docházelo nejprve ke vzniku pěny, která se postupně lepila na míchadlo a tím následně vznikaly sraženiny. Stejný jev byl pozorován u vzorku s 0,1% F-127 za použití organického rozpouštědla CCl_3. Z toho lze vyvodit to, že poloxamer 407 v této nízké koncentraci poskytuje nedostatečnou sterickou stabilizaci vzniklé emulze, a to vede ke koalescenci emulze.

Surfaktanty byly použité pro stérickou stabilizaci hydrofobního povrchu polymeru jeho obalením hydrofilní vrstvou povrchově aktivní látky pro umožnění podání do krevního řečiště. Hydrofilizací polymerního povrchu se předchází časné opsonizaci imunitním systémem, a to umožňuje podání léčiva přímo do místa účinku prostřednictvím hydrofilních neutrálních částic. [3, 77]

V grafu 7 lze pozorovat, že naměřené velikosti částic připravených vzorků se pohybují v rozmezí hodnot větších než 100 nm a menších než 6 µm. Ve vzorcích, ve kterých byl použit surfaktant PVA o koncentraci 3 % lze pozorovat naměřené velikosti částic větší než 1000 nm, což se již ve farmaceutickém použití neakceptuje jako nanomateriál. [1, 78, 79] Vysoké velikosti nanočástic připravených s 3% PVA se všemi organickými rozpouštědly mohou být způsobené zvýšením viskozity vodní fáze vysokou koncentrací surfaktantu. Největší velikosti částic byly naměřeny u vzorků za použití surfaktantu 3% PVA ve všech třech rozdílných organických rozpouštědlech. PVA má poněkud odlišný mechanismus stabilizace emulze na rozdíl od typických surfaktantů typu poloxamer nebo například polysorbáty. Jedná se o látku s relativně velkou molární hmotností (cca 30 kDa). Byť se jedná také o látku, která je povrchově aktivní, významnou složkou jeho stabilizačního účinku na disperzní soustavy je zvyšování viskozity vodné fáze. PVA v koncentraci 3 % tedy pravděpodobně zvýší viskozitu vodné fáze natolik, že to znemožní efektivní emulgaci s pomocí ultrazvuku. Pro porovnání v jiném článku výsledky ukazují, že zvyšující koncentrace surfaktantu PVA dochází při přípravě k formulaci menších velikostí částic. Avšak tento jev není lineární, protože při dalším zvyšování koncentrace surfaktantu PVA v pokusu, naopak vedlo k přípravě větších rozměrů částic. Zároveň tento pozorovaný efekt byl paralelní se zvyšující se viskozitou [80]. Zároveň jejich výsledky ukazují, že připravené částice za použití PVA s vysokou molární hmotností měli menší rozměry velikostí částic v porovnání s připravenými vzorky nanočástic obsahující PVA s nízkou molární hmotností. Proto výsledky naznačují, že PVA s vysokou molární hmotností je účinnější z důvodů prevence shlukování částic během procesu solidifikace - vypařování organického rozpouštědla [80]. Pro porovnání v dalších článcích výsledky ukazují vliv koncentrace surfaktantu na výslednou velikost nanočástic takto, zvyšující se koncentrace surfaktantu zajišťuje lepší emulzifikační proces, který má za následek přípravu menších částic s uspokojivým PDI [2, 81].



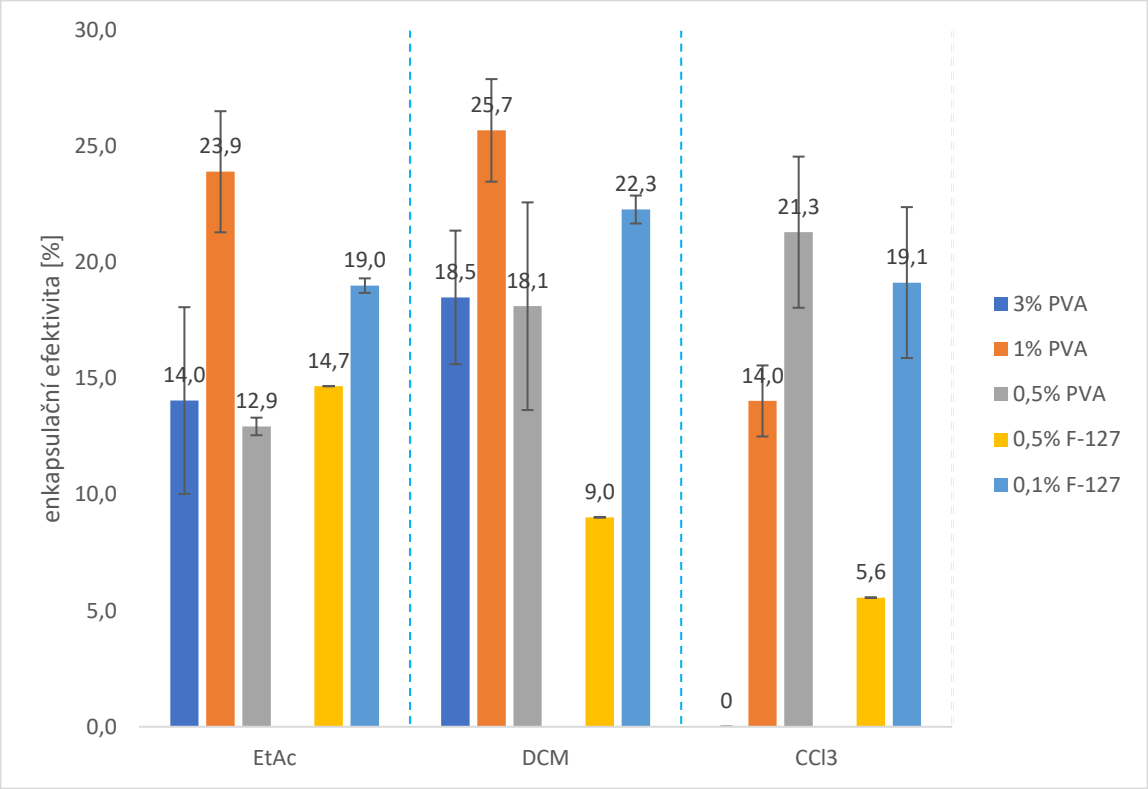
Graf 8:Závislost PDI nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA

V grafu 8 jsou znázorněny sloupce hodnot představující závislost PDI nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA použitých při jejich přípravě. Z výsledků je patrné, že nejnižších hodnot bylo dosaženo za použití EtAc s 0,5% PVA a DCM s 1% PVA. Hodnota PDI nanočastic vzorku s použitím surfaktantu 0,1% F-127 a organického rozpouštědla DCM nebyla naměřena z důvodu vzniku sraženin PLGA během přípravy nanočástic.

Hodnoty PDI vzorků polymerních nanočástic se pohybují v rozmezí 0,2 – 0,3 pouze u vzorků: 0,5% a 1% PVA s organickými rozpouštědly DCM a CCl_3. PDI pod hodnotu 0,3 se je obecně považováno na za přijatelnou míru polydisperzity a takové nanočástice jsou vhodné pro biologické aplikace. Hodnota PDI vzorku 0,5% PVA s EtAc je nižší než 0,1, což poukazuje na jeho monodisperzitu. Zbylé vzorky svými naměřenými hodnotami mezní hodnotu PDI 0,3 přesahují, což značí velmi polydisperzní vzorky. [72, 73].

Při porovnání hodnot v grafech 7 a 8 lze pozorovat, že vhodnou velikost nanočástic a hodnotu PDI vykazuje vzorek připravený za použití 0,5% PVA s EtAc (259,4 nm; PDI 0,068). Vzorky s hodnotou PDI v rozmezí hodnot 0,2-0,3 a velikostí nanočástic přesahující 300 nm, která již není žádaná pro efektivní uptake částic

fagocytujícími buňkami jsou připravené s 1% a 0,5% PVA v organických rozpouštědlech DCM a CCl3. Vzorek připravený s 0,1% Pluronic® F-127 a DCM nebyl proměřen z důvodu selhání přípravy nanočástic, došlo k viditelnému vysrážení částic PLGA. Vzorek s použitým Pluronic® F-127 s CCl3, také viditělně nevykazoval uniformitu systému pozorovatelnými sraženinami. Poloxamer Pluronic F-127 není vhodným emulgátorem pro přípravu nanočástic dvojitě emulzní metodou. Naproti tomu PVA v koncentraci 0,5 % a 1 % se jeví jako vhodnější volba. Pravděpodobně to bylo způsobené vysokou koncentrací PLGA (50mg/ml) ve vzorku a vysokým mezipovrchovým napětím. Řešením této obtíže může být buď snížení použité koncentrace PLGA, nebo druhou možností může být naopak zvýšení koncentrace použitého surfaktantu Pluronic® F-127.



Graf 9: Závislost enkapsulační efektivity nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA

Výsledky % EE zobrazené na grafu 9 ukazují, že u těch NP, které se podařilo připravit jako stabilní suspenzi ukazují, že % EE se pohybovala v rozmezí 5,6 až 25,7 %. Nejvyšších hodnot EE bylo dosaženo ve vzorcích obsahující 1% PVA s organickými rozpouštědly DCM (EE=25,7 %) a EtAc (EE=23,9 %), 0,5 % PVA s CCl_3(EE=21,3 %). Obecně lze konstatovat, že pro efektivní enkapsuplaci je vhodným stabilizátorem PVA

v koncentracích 0,5 a 1 %. Mechanismem stabilizace nanosuspenzí je u PVA modifikace viskozity vodné fáze a pro dané podmínky přípravy se tyto koncentrace jeví jako nejvhodnější. Ve výsledcích s vysokými EE u většiny vzorků se jeví nejlepším organickým rozpouštědlem DCM a stabilizátorem 1% PVA. Enkapsulační efektivita vzorků s 0,1% F-127 za použití všech organických rozpouštědel PLGA byla naměřená takto vysoká z důvodu falešně pozitivního výsledku při přípravě nanočástic. Během přípravy došlo ke sražení PLGA ve vzorcích z důvodu vysoké koncentrace PLGA (50mg/ml) ve vzorku, tedy nízké koncentraci surfaktantu Pluronic® F–127 (0,1% F-127). Tento jev mohl zapříčinit vyvázání části obsahu gentamicin sulfátu ve vzorku. Nejnižších hodnot EE bylo naměřeno ve vzorcích, ve kterých byli použité 0,5% F-127 s organickými rozpouštědly CCl_3 (EE=5,6 %) a DCM (EE=9,0 %), 0,5 % PVA s EtAc (EE=12,9 %), 3% PVA. Hodnoty vzorku, při kterém byl použit surfaktant 3% PVA a organické rozpouštědlo CCl_3 nejsou znázorněny z důvodu opakovaného naměření vyšší koncentrace gentamicin sulfátu v supernatantu, než byla původní použitá koncentrace gentamicinu při přípravě (0,8mg/ml gentamicin sulfátu) ve všech opakovacích sadách vzorků (tzn. 3 opakování – vzorky A, B, C), vycházely vždy záporné hodnoty EE [%]. Obecně lze konstatotvat, že pro dovjitě emulzní metodu přípravyPLGA nanočástic je rozhodující volba stabilizátoru. V této práci bylo nejlepších výsledků dosaženo s PVA.

Porovnáním grafů 7, 8, a 9 lze ve výsledcích pozorovat, že vzorek 1% PVA s DCM (403,2 nm; PDI 0,203) vykazuje nejvyšší EE 25,7 % a u vzorku 0,5% PVA s EtAc (259,4 nm; PDI 0,068) vychází EE 12,9%. Ze zkoumání dat vyplývá, že naměřené výsledky nepotvrzují předpoklad závislosti EE na velikosti nanočástic. Větší částice mají vyšší obsah léčiva, protože méně molekul léčiva má dostatečný čas difungovat do vodné fáze. Nicméně z našich výsledků vyplývá, že se EE se zvyšující se velikostí částic nezvyšuje [13, 82]. Hlavní roli tak zřejmě hraje výběr vhodného stabilizátoru. Kdy právě PVA svým efektem na vodnou fázi sníží mobilitu částic a svoji vysokou molární hmostností poskytne vyšší míru stabilizace povrchu a zabrání tak úniku gentamicinu z nosiče.

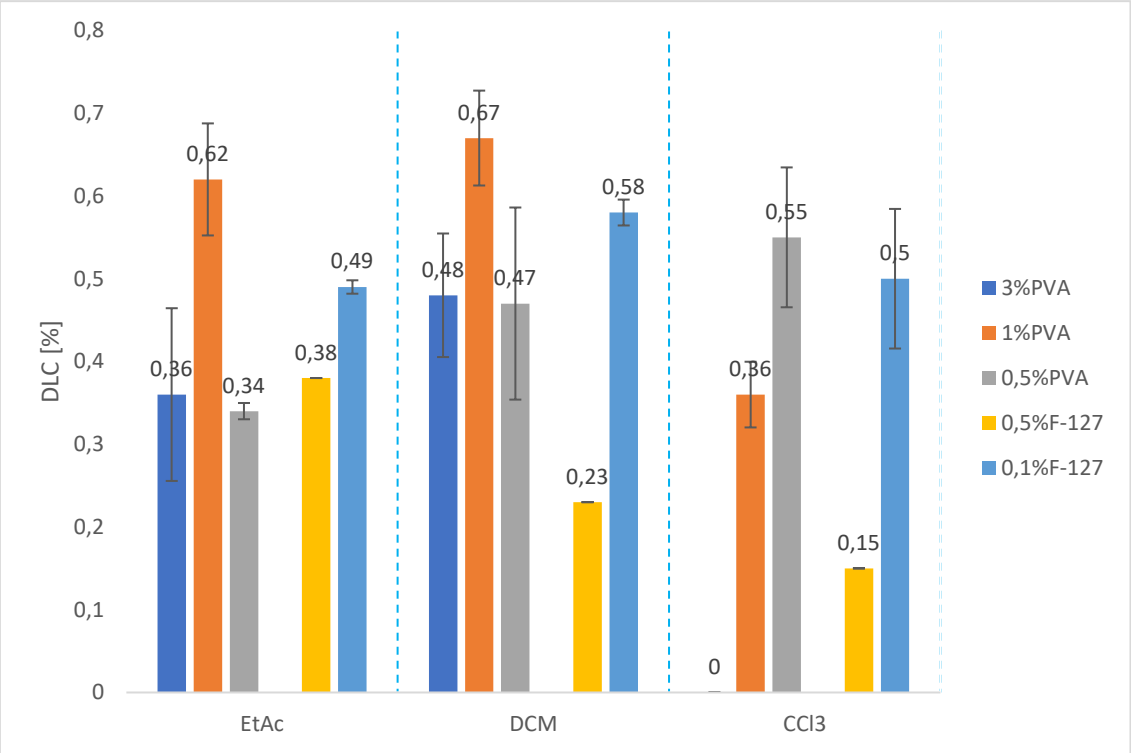
Předešlý výzkum ukazuje, že ovlivnění EE a DLC je závislé na dávce tzn. navážením vyššího iniciálního množství účinné látky ovlivňuje výslednou EE a DLC připravených nanočástic [83].

Dále lze pozorovat, že se zvyšující se koncentrací povrchově aktivních látek PVA i Pluronic® F-127 se nesnižuje velikost připravených částic, jak by se mohlo

předpokládat z důvodu zajištění efektivnějšího procesu emulgace vyšší koncentrací surfaktantu. To může být vysvětleno, že při použití vysoké koncentrace surfaktantu s výslednou přípravou velkých částic, dochází pravděpodobně nejprve k tvorbě příliš malých částic, které se k sobě následně shlukují a zůstávají u sebe přichycené použitým emulgátorem. Další možností je, že menší částice mají větší povrch, tím pádem je vyšší spotřeba surfaktantu, ale při dále se zvyšující koncentraci surfaktantu dochází ke zvýšení viskozity vodní fáze. Tím pádem dochází ke zmenšení dostupnosti redukce kapek, a proto dochází ke tvorbě větších rozměrů nanočástic. [2, 82, 84]

Z výsledků v grafech 7 a 9 je patrné, že vyšší koncentrace PVA (3 %) a ani poloxameru Pluronic® F-127 (0,5 %) neovlivnila kladně EE a ani velikost nanočástic ve smyslu zvýšení EE a přípravy menších velikostí nanočástic. Z výsledků je patrné, že užití surfaktantu PVA je vhodnějším surfaktantem než poloxamer Pluronic® F-127 při přípravě nanočástic. Vyšší vhodnost surfaktantu PVA, než poloxameru může být způsobena odlišnou chemickou strukturou [85]. Tento výsledek vyšel také v jiném článku, kde byly pro pokusy použité PVA, PVP a poloxamer. Pro další pokusy by bylo možné porovnat použití surfaktantu polyvinylpyrrolidonu (PVP) z důvodu dosažení podobných výsledků jako s PVA v odlišném pokusu. [2, 84]

V minulosti široce využívaná organická rozpouštědla DCM a CCl_3 jsou nahrazována EtAc z důvodu jeho lepšího toxikologického profilu [2]. Z výsledků nelze vypozorovat, že by druh organického rozpouštědla ovlivnil velikost či obsah léčiva v připravených částicích. Použití EtAc jako organické fáze produkovalo menší nanočástice ve srovnání s chlorovanými rozpouštědly. Pro další pokusy by bylo možné změnit objem organického rozpouštědla, což by již mohlo mít vliv na připravené nanočástice s enkapsulovaným léčivem. [82]



Graf 10: Závislost DLC – kapacity naplnění léčivem na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA

V grafu 10 jsou znázorněny sloupce hodnot představující závislost kapacity naplnění léčivem na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA použitých při jejich přípravě. Z výsledků je patrné, že nejvyšších naměřených hodnot DLC bylo dosaženo při použití 1% PVA, 0,1% F-127 a 0,5% PVA. Vzorky se surfaktantem 1% PVA nejvyšší naměřené hodnoty DLC lze pozorovat u organických rozpouštědel EtAc a DCM, oproti tomu u organického rozpouštědla CCl_3 pozorujeme naměřenou téměř jen jejich poloviční hodnotu DLC. Vzorky se surfaktantem 0,5% PVA vykazují nejvyšší naměřené hodnoty DLC s organickými rozpouštědly CCl_3 a DCM. Nejnižších hodnot DLC bylo dosaženo u vzorků s 0,5% F-127. U vzorků s použitým surfaktantem 3% PVA pozorujeme nízkou DLC, která může být způsobena lidskou chybou během přípravy nanočástic při navažování PLGA či pipetování organických rozpouštědel, která by tím pádem způsobila změnu viskozity organické fáze. U všech vzorků vidíme relativně nízkou DLC, která nedosahuje ani 1 % tím pádem je zde velký prostor pro zlepšení DLC nanočástic.

6 Závěr

Tento projekt diplomové práce se zabýval přípravou polymerních nanočástic dvojitě emulzní odpařovací metodou, do kterých bylo enkapsulováno aminoglykosidové antibiotikum gentamicin sulfát pro cílenou terapii nitrobuněčných patogenů. K přípravě nanočástic byl používán biologicky rozložitelný polymer PLGA Purasorb® PDLG 5002A s poměrem GA:LA 50:50, dále byla použita organická rozpouštědla EtAc, DCM CCl_3 a povrchově aktivní látky PVA a Pluronic® F-127.

Další fáze práce se zabývala zkoumáním DLC nanočástic a zjištěním enkapsulovaného množství API v připravených polymerních nanočásticích pomocí metod spektrofotometrie a HPLC. Pomocí nepřímé metody pro vyhodnocení obsahu API (gentamicin sulfátu) v nanočásticích byly provedeny derivatizační reakce zbylého neenkapsulovaného antibiotika gentamicin sulfátu v supernatantu vzorků. Pro spektrofotometrii se na gentamicin sulfát zavedl chromofor derivatizační reakcí s ninhydrinem a pro vyhodnocení vzorků na HPLC – FLD byl zaveden fluorofor derivatizační reakcí s Fmoc-Cl. Z důvodu selhání derivatizační reakce s ninhydrinem vyšly z měření na spektrofotometru nesměrodatné výsledky, a proto bylo pro další pokračovaní zvoleno zavedení fluoroforu pro proměření na HPLC – FLD.

Nejvyšších enkapsulačních efektivit bylo dosaženo ve vzorcích polymerních nanočástic za použití při jejich přípravě 1% PVA s EtAc a DCM, 0,5 % PVA s DCM a CCl_3.

Vzorek připravený za použití surfaktantu 0,5% PVA a organického rozpouštědla EtAc (259,4 nm; PDI 0,068; 12,9 % EE) vykazuje nejlepší velikost nanočástic a PDI, a proto jej lze považovat jako vhodný DDS pro cílené podávání léčiv.

7 Seznam obrázků, grafů, rovnic a tabulek

Obrázek 1: Struktury lipidových nanočástic (Created in https://BioRender.com) 3
Obrázek 2: Struktury anorganických nanočástic – uhlíkaté nanotrubičky (Created in https://BioRender.com) 4
Obrázek 3: Schéma polymerních nanočástic (Created in https://BioRender.com) 6
Obrázek 4: Metabolické cesty rozkladu biologicky rozložitelných polymerů [3] 7
Obrázek 5: Schéma rozkladu PLGA 8
Obrázek 6: Mechanismy uvolňování léčiv z NP (Created in https://BioRender.com) 13
Obrázek 7: Vzorec gentamicinu (ChemDraw) 23
Obrázek 8: Znázornění postupu přípravy polymerní nanočástic typu v/o/v (Created in https://BioRender.com) 28

Graf 1: Kalibrační křivka 3% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC-FLD 32
Graf 2: Kalibrační křivka 1% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD 33
Graf 3: Kalibrační křivka 0,5% PVA (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD 33
Graf 4: Kalibrační křivka 0,5% F-127 (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD 34
Graf 5: Kalibrační křivka 0,1% F-127 (1.peak) pro stanovení EE – metoda HPLC – FLD 34
Graf 6: Kalibrační křivka gentamicin sulfátu derivatizovaného ninhydrinem pro spektrofotometrické měření při λ= 440nm 35
Graf 7: Závislost velikosti nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA 39
Graf 8:Závislost PDI nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA 41
Graf 9: Závislost enkapsulační efektivity nanočástic na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA 42
Graf 10: Závislost DLC – kapacity naplnění léčivem na použitém surfaktantu v rozdílných organických rozpouštědlech PLGA 45

Tabulka 1: Vzorky PLGA 50:50 rozpuštěné v rozdílných organických rozpouštědlech. Naměřené hodnoty vzorků nanočástic – velikost, PDI, enkapsulační efektivita, DLC 37
Tabulka 2: Hodnoty vzorků derivatizované ninhydrinem pro proměření metodou spektrofotometrie 38

Rovnice 1: Výpočet enkapsulační efektivity 29
Rovnice 2: Výpočet drug- loading kapacity 30

8 Seznam zkratek

ACN	acetonitril
API	léčivá látka (z angl. *active pharmaceutical ingredient*)
ATB	antibiotikum
CCl_3	chloroform
DCM	dichlormetrhan
DDS	drug delivery systém
DLC	kapacita naplnění léčivem (z angl. drug-loading capacity)
EE	enkapsulační efektivita (z angl. *encapsulation efficiency; entrepment efficiency*)
EMA	Evropská léková agentura (z angl. *European medicines agency*)
EPR	efekt zvýšené permeability a retence (z angl. *enhanced retention and permeability effect*)
EtAc	ethylacetát
F-127	poloxamer Pluronic® F-127
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. *Food and Drug Administration*)
Fmoc-Cl	9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid
HPLC – FLD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí

MDR	rezistence k vyššímu počtu léčiv (z angl. *multi-drug resistence*)
MF	mobilní fáze
MFS	mononukleárně fagocytický systém
PACA	poly(alkylkyanoakrylát)
PAL	povrchově aktivní látka
PBS	fofátový pufr (z angl. *phosphate buffer saline*)
PCL	poly(ε-kaprolakton)
PDI	index polydisperzity
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kyselina poly(mléčná-ko-glykolová)
NP	polymerní nanočástice
Poměr GA:LA	poměr kyseliny glykolové a mléčné v polymeru
PRR	patogeny rozeznávající receptory (z angl. *Patern recognition receptor*)
PVA	polyvinyl alkohol
RCF	relativní odstředivá síla (z angl. *relative centrifugal field*)

RES	retikuloendoteliální systém, monocyto-makrofágový systém
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SF	stacionární fáze
SLN	pevné lipidické nanočástice (z angl. *solid lipid nanoparticles*)
TLR	Toll – like receptor
VPF	vaskulární permeační kaktor (z angl. *vascular permeability factor*)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)
PEG	polyethylenglykol
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. *vascular endothelial growth factor*)
G – bakterie	Gram negativní bakterie
MIC	minimální inhibiční koncentrace
RPM; rpm	otáčky za minutu (z angl. *Revolutions per minute*)

9 Literatura

[1] KUBACKOVA, Jana, Jarmila ZBYTOVSKA a Ondrej HOLAS. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, **142**, 105139. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2019.105139

[2] RAO, J. Prasad a Kurt E. GECKELER. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011,

36(7), Special Issue on Composites, 887–913. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001

[3] TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(4), 555–577. ISSN 1550-7033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017

[4] DANHIER, Fabienne, Eduardo ANSORENA, Joana M. SILVA, Régis COCO, Aude LE BRETON a Véronique PRÉAT. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, **161**(2), 505–522. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043

[5] PARVEEN, Suphiya, Ranjita MISRA a Sanjeeb K. SAHOO. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2012, **8**(2), 147–166. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2011.05.016

[6] YETISGIN, Abuzer Alp, Sibel CETINEL, Merve ZUVIN, Ali KOSAR a Ozlem KUTLU. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules* [online]. 2020, **25**(9), 2193. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25092193

[7] DE JESUS, Marcelo B. a Inge S. ZUHORN. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **201**, 1–13. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.01.010

[8] ANZAR, Nigar, Rahil HASAN, Manshi TYAGI, Neelam YADAV a Jagriti NARANG. Carbon nanotube - A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science. *Sensors International* [online]. 2020, **1**, 100003. ISSN 2666-3511. Dostupné z: doi:10.1016/j.sintl.2020.100003

[9] WAKASKAR, Rajesh R. General overview of lipid–polymer hybrid nanoparticles, dendrimers, micelles, liposomes, spongosomes and cubosomes. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2018, **26**(4), 311–318. ISSN 1061-186X, 1029-2330. Dostupné z: doi:10.1080/1061186X.2017.1367006

[10] DIAS, Ana Paula, Soraya DA SILVA SANTOS, João Vitor DA SILVA, Roberto PARISE-FILHO, Elizabeth IGNE FERREIRA, Omar El SEOUD a Jeanine GIAROLLA. Dendrimers in the context of nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, **573**, 118814. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118814

[11] KIANFAR, Ehsan. Dendrimers in Medicine: Properties, Drug Encapsulation Mechanisms and Applications. *Trends in Sciences* [online]. 2025, **22**(8), 1–39. ISSN 2774-0226. Dostupné z: doi:10.48048/tis.2025.10085

[12] SUNDAR, Sushmitha, Joydip KUNDU a Subhas C KUNDU. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2010, **11**(1), 014104. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/11/1/014104

[13] HANS, M L a A M LOWMAN. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002.

[14] MUKHERJEE, Chandrapaul, Dissa VARGHESE, J. S. KRISHNA, T. BOOMINATHAN, R. RAKESHKUMAR, S. DINESHKUMAR, C. V. S. BRAHMANANDA RAO a Akella SIVARAMAKRISHNA. Recent advances in biodegradable polymers – Properties, applications and future prospects. *European Polymer Journal* [online]. 2023, **192**, 112068. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2023.112068

[15] ZAMBOULIS, Alexandra, Eirini A. NAKIOU, Evi CHRISTODOULOU, Dimitrios N. BIKIARIS, Eleana KONTONASAKI, Liliana LIVERANI a Aldo R. BOCCACCINI. Polyglycerol Hyperbranched Polyesters: Synthesis, Properties and Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(24), 6210. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20246210

[16] TAMMAM, Salma N., Hassan M. E. AZZAZY a Alf LAMPRECHT. Biodegradable Particulate Carrier Formulation and Tuning for Targeted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2015, **11**(4), 555–577. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2015.2017

[17] IQBAL, Muhammad, Nadiah ZAFAR, Hatem FESSI a Abdelhamid ELAISSARI. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **496**(2), 173–190. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.057

[18] BEHL, Akanksha, Virinder S. PARMAR, Shashwat MALHOTRA a Anil K. CHHILLAR. Biodegradable diblock copolymeric PEG-PCL nanoparticles: Synthesis, characterization and applications as anticancer drug delivery agents. *Polymer* [online]. 2020, **207**, 122901. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.122901

[19] AHMAD SHARIFF, Siti Hajar, Wan Khartini WAN ABDUL KHODIR, Shafida ABD HAMID, Muhammad Salahuddin HARIS a Mohamad Wafiuddin ISMAIL. Poly(caprolactone)-b-poly(ethylene glycol)-Based Polymeric Micelles as Drug Carriers for Efficient Breast Cancer Therapy: A Systematic Review. *Polymers* [online]. 2022, **14**(22), 4847. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14224847

[20] HAMIDI, Mehrdad, Amir AZADI a Pedram RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(15), 1638–1649. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.08.002

[21] KUMARI, Avnesh, Sudesh Kumar YADAV a Subhash C. YADAV. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, **75**(1), 1–18. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001

[22] MORADI KASHKOOLI, Farshad, M. SOLTANI a Mohammad SOURI. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and

dynamic targeting strategies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2020, **327**, 316–349. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2020.08.012

[23] KAMALY, Nazila, Basit YAMEEN, Jun WU a Omid C. FAROKHZAD. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews* [online]. 2016, **116**(4), 2602–2663. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346

[24] SIEGEL, Ronald A. a Michael J. RATHBONE. Overview of Controlled Release Mechanisms. In: Juergen SIEPMANN, Ronald A. SIEGEL a Michael J. RATHBONE, ed. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* [online]. Boston, MA: Springer US, 2012 [vid. 2024-04-09], s. 19–43. ISBN 978-1-4614-0880-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-0881-9_2

[25] KUMARI, Preeti, Balaram GHOSH a Swati BISWAS. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2016, **24**(3), 179–191. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2015.1051049

[26] DENG, Yudi, Xudong ZHANG, Haibin SHEN, Qiangnan HE, Zijian WU, Wenzhen LIAO a Miaomiao YUAN. Application of the Nano-Drug Delivery System in Treatment of Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2019, **7**, 489. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2019.00489

[27] MAEDA, H., G. Y. BHARATE a J. DARUWALLA. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2009, **71**(3), Engineered polymers in controlled drug delivery and targeting, 409–419. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2008.11.010

[28] MAEDA, Hiroshi, Jun FANG, Takao INUTSUKA a Yasunori KITAMOTO. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *International Immunopharmacology* [online]. 2003, **3**(3), 319–328. ISSN 1567-5769. Dostupné z: doi:10.1016/S1567-5769(02)00271-0

[29] PEARCE, Amanda K. a Rachel K. O'REILLY. Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2019, **30**(9), 2300–2311. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00456

[30] BYRNE, James D., Tania BETANCOURT a Lisa BRANNON-PEPPAS. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(15), 2008 Editors' Collection, 1615–1626. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.08.005

[31] THAKUR, Aneesh, Heidi MIKKELSEN a Gregers JUNGERSEN. Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *Journal of Immunology Research* [online]. 2019, **2019**, 1356540. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2019/1356540

[32] QIU, Yuanhao, Dan XU, Guoqing SUI, Dongdong WANG, Ming WU, Lipeng HAN, Haibo MU a Jinyou DUAN. Gentamicin decorated phosphatidylcholine-chitosan nanoparticles against biofilms and intracellular bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **156**, 640–647. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.090

[33] HOSSEINI, Seyed Mostafa, Mohammad TAHERI, Fatemeh NOURI, Abbas FARMANI, Narjes Morovati MOEZ a Mohammad Reza ARABESTANI. Nano drug delivery in intracellular bacterial infection treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 2022, **146**, 112609. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.112609

[34] IMBULUZQUETA, Edurne, Carlos GAMAZO, Hugo LANA, Miguel Ángel CAMPANERO, David SALAS, Ana Gloria GIL, Elisa ELIZONDO, Nora VENTOSA, Jaume VECIANA a María J. BLANCO-PRIETO. Hydrophobic Gentamicin-Loaded Nanoparticles Are Effective against Brucella melitensis Infection in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(7), 3326–3333. Dostupné z: doi:10.1128/aac.00378-13

[35] LECAROZ, Concepcion, Carlos GAMAZO, María Jesus RENEDO a María J. BLANCO-PRIETO. Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for gentamicin. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2006, **23**(7), 782–792. ISSN 0265-2048. Dostupné z: doi:10.1080/02652040600946886

[36] QURESHI, Kamal A., Adil PARVEZ, Nada A. FAHMY, Bassant H. ABDEL HADY, Shweta KUMAR, Anusmita GANGULY, Akhtar ATIYA, Gamal O. ELHASSAN, Saeed O. ALFADLY, Seppo PARKKILA a Ashok ASPATWAR. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment–a comprehensive review. *Annals of Medicine* [online]. 2023, **55**(2), 2295398. ISSN 0785-3890. Dostupné z: doi:10.1080/07853890.2023.2295398

[37] DEGABRIEL, Manon, Stanimira VALEVA, Sandrine BOISSET a Thomas HENRY. Pathogenicity and virulence of Francisella tularensis. *Virulence* [online]. 2023, **14**(1), 2274638. ISSN 2150-5608. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2023.2274638

[38] BAKER, Stephen a Hao Chung THE. Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Current Opinion in Infectious Diseases* [online]. 2018, **31**(5), 449–454. ISSN 0951-7375. Dostupné z: doi:10.1097/QCO.0000000000000475

[39] KOTLOFF, Karen L, Mark S RIDDLE, James A PLATTS-MILLS, Patricia PAVLINAC a Anita K M ZAIDI. Shigellosis. *The Lancet* [online]. 2018, **391**(10122), 801–812. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(17)33296-8

[40] SHARIATI, Aref, Zahra CHEGINI, Ehsanollah GHAZNAVI-RAD, Ehsan Nazarzadeh ZARE a Seyed Mostafa HOSSEINI. PLGA-Based Nanoplatforms in Drug Delivery for Inhibition and Destruction of Microbial Biofilm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2022, **12** [vid. 2024-11-10]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2022.926363

[41] ABDELGHANY, Sharif M, Derek J QUINN, Rebecca J INGRAM, Brendan F GILMORE, Ryan F DONNELLY, Clifford C TAGGART a Christopher J SCOTT. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards Pseudomonas aeruginosa infection. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2012, **7**, 4053–4063. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S34341

[42] THI, Minh Tam Tran, David WIBOWO a Bernd H.A. REHM. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(22), 8671. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21228671

[43] WU, Weihui, Yongxin JIN, Fang BAI a Shouguang JIN. Chapter 41 - Pseudomonas aeruginosa. In: Yi-Wei TANG, Max SUSSMAN, Dongyou LIU, Ian POXTON a Joseph SCHWARTZMAN, ed. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)* [online]. Boston: Academic Press, 2015 [vid. 2025-03-20], s. 753–767. ISBN 978-0-12-397169-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X

[44] BERNUT, Audrey, Claudine BELON, Chantal SOSCIA, Sophie BLEVES a Anne-Béatrice BLANC-POTARD. Intracellular phase for an extracellular bacterial pathogen: MgtC shows the way. *Microbial Cell* [online]. nedatováno, **2**(9), 353–355. ISSN 2311-2638. Dostupné z: doi:10.15698/mic2015.09.227

[45] SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas, Saeed MOHAMMADIAN, Hossein VAZINI, Mahdi TAGHADOSI, Seyed-Alireza ESMAEILI, Fatemeh MARDANI, Bita SEIFI, Asadollah MOHAMMADI, Jalil T. AFSHARI a Amirhossein SAHEBKAR. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2018, **233**(9), 6425–6440. ISSN 0021-9541, 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.26429

[46] RAZEI, Ali, Mohammad JAVANBAKHT, Abbas HAJIZADE, Mohammad HEIAT, Shi ZHAO, Hossien AGHAMOLLAEI, Mojtaba SAADATI, Mostafa KHAFAEI, Mosa ASADI, Luca CEGOLON a Amir Homayoun KEIHAN. Nano and microparticle drug delivery systems for the treatment of *Brucella* infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2023, **169**, 115875. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2023.115875

[47] CELLI, Jean. Surviving inside a macrophage: The many ways of *Brucella*. *Research in Microbiology* [online]. 2006, **157**(2), 93–98. ISSN 0923-2508. Dostupné z: doi:10.1016/j.resmic.2005.10.002

[48] KASSINGER, Stephen J. a Monique L. VAN HOEK. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in Francisella. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, **12**, 644855. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.644855

[49] SHAD, Ahtesham Ahmad a Wajahat Ahmed SHAD. Shigella sonnei: virulence and antibiotic resistance. *Archives of Microbiology* [online]. 2021, **203**(1), 45–58. ISSN 1432-072X. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-020-02034-3

[50] ASHIDA, Hiroshi, Toshihiko SUZUKI a Chihiro SASAKAWA. Shigella infection and host cell death: a double-edged sword for the host and pathogen survival. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2021, **59**, 1–7. ISSN 1879-0364. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2020.07.007

[51] PAKBIN, Babak, Wolfram Manuel BRÜCK a Thomas B. BRÜCK. Molecular Mechanisms of Shigella Pathogenesis; Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(3), 2448. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24032448

[52] RESKO, Zachary J., Rachel F. SUHI, Adam V. THOTA a Abby R. KROKEN. Evidence for intracellular Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology* [online]. nedatováno, **206**(5), e00109-24. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.00109-24

[53] ROWE, Warren J., Deborah A. LEBMAN a Dennis E. OHMAN. Mechanism of resistance to phagocytosis and pulmonary persistence in mucoid Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2023, **13**, 1125901. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2023.1125901

[54] MOUSSOUNI, Malika, Laurence BERRY, Tamara SIPKA, Mai NGUYEN-CHI a Anne-Béatrice BLANC-POTARD. Pseudomonas aeruginosa OprF plays a role in resistance to macrophage clearance during acute infection. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 359. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-79678-0

[55] MAURIN, Max, Léa PONDÉRAND, Aurélie HENNEBIQUE, Isabelle PELLOUX, Sandrine BOISSET a Yvan CASPAR. Tularemia treatment: experimental and clinical data. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2024, **14**, 1348323. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2023.1348323

[56] KUBELKOVA, Klara a A. MACELA. Putting Jigsaw Together - A Brief Insight Into the Tularemia. *Central European Journal of Biology* [online]. 2015, **10**, 117–138. Dostupné z: doi:10.1515/biol-2015-0013

[57] REYNOLDS, Dan a Marin KOLLEF. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. *Drugs* [online]. 2021, **81**(18), 2117–2131. ISSN 1179-1950. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-021-01635-6

[58] KARRULI, Arta, Christian CATALINI, Chiara D'AMORE, Francesco FOGLIA, Fabio MARI, Arjan HARXHI, Massimiliano GALDIERO a Emanuele DURANTE-MANGONI. Evidence-Based Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: A Critical Reappraisal. *Antibiotics* [online]. 2023, **12**(2), 399. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics12020399

[59] ZAKHOUR, Johnny, Sima L. SHARARA, Joya-Rita HINDY, Sara F. HADDAD a Souha S. KANJ. Antimicrobial Treatment of Pseudomonas aeruginosa Severe Sepsis. *Antibiotics* [online]. 2022, **11**(10), 1432. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11101432

[60] KUMAR, Lalit, Shivani VERMA, Bhuvaneshwar VAIDYA a Neelesh K. MEHRA. Chapter 13 - Nanocarrier-Assisted Antimicrobial Therapy Against Intracellular Pathogens. In: Anton FICAI a Alexandru Mihai GRUMEZESCU, ed. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* [online]. B.m.: Elsevier, 2017

[vid. 2024-11-10], Micro and Nano Technologies, s. 293–324. ISBN 978-0-323-46152-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00013-5

[61] VARAPRASAD, Kokkarachedu, Murali Mohan YALLAPU, Dariela NÚÑEZ, Patricio OYARZÚN, Matias LÓPEZ, Tippabattini JAYARAMUDU a Chandrasekaran KARTHIKEYAN. Generation of engineered core–shell antibiotic nanoparticles. *RSC Advances* [online]. nedatováno, **9**(15), 8326–8332. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c9ra00536f

[62] LECAROZ, M.C., M.J. BLANCO-PRIETO, M.A. CAMPANERO, H. SALMAN a C. GAMAZO. Poly(D,L-lactide-coglycolide) particles containing gentamicin: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in Brucella melitensis-infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2007, **51**(4), 1185–1190. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00809-06

[63] PRIOR, Sandra, Bruno GANDER, Concepción LECÁROZ, Juan M. IRACHE a Carlos GAMAZO. Gentamicin-loaded microspheres for reducing the intracellular Brucella abortus load in infected monocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2004, **53**(6), 981–988. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkh227

[64] AKHTAR, Bushra, Faqir MUHAMMAD, Bilal ASLAM, Muhammad Kashif SALEEMI a Ali SHARIF. Pharmacokinetic profile of chitosan modified poly lactic co-glycolic acid biodegradable nanoparticles following oral delivery of gentamicin in rabbits. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **164**, 1493–1500. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.206

[65] GAMAZO, Carlos, Sandra PRIOR, María CONCEPCIÓN LECÁROZ, Ana Isabel VITAS, Miguel Angel CAMPANERO, Guiomar PÉREZ, David GONZALEZ a María Jose BLANCO-PRIETO. Biodegradable gentamicin delivery systems for parenteral use for the treatment of intracellular bacterial infections. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2007, **4**(6), 677–688. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.4.6.677

[66] GHAFFARI, Solmaz, Jaleh VARSHOSAZ, Afrooz SAADAT a Fatemeh ATYABI. Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2011, **6**, 35–43. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S13671

[67] ALFARO-VIQUEZ, Emilia, Daniel ESQUIVEL-ALVARADO, Sergio MADRIGAL-CARBALLO, Christian G. KRUEGER a Jess D. REED. Antimicrobial proanthocyanidin-chitosan composite nanoparticles loaded with gentamicin. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **162**, 1500–1508. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.213

[68] KARUNARATHNA, Indunil, P GUNASENA, S GUNATHILAKE, T HAPUARACHCHI, S RAJAPAKSHA, K GUNAWARDANA, P ALUTHGE, Sau BANDARA, Asoka JAYAWARDANA a Kapila ALVIS. Antibiotic Resistance and Gentamicin: Current Trends and Clinical Implications. In: . 2024, s. 152–163. ISBN 9786249372108.

[69] SOJO-DORADO, Jesús a Jesús RODRÍGUEZ-BAÑO. Gentamicin. In: *Kucers' The Use of Antibiotics*. 7. vyd. B.m.: CRC Press, 2017. ISBN 978-1-315-15211-0.

[70] Aminoglycosides. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012 [vid. 2024-09-22]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548232/

[71] Gentamicin. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [online]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012 [vid. 2024-09-22]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548706/

[72] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, **8**(4), 409–427. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6

[73] RODRIGUEZ-LOYA, Jesus, Maricarmen LERMA a Jorge L. GARDEA-TORRESDEY. Dynamic Light Scattering and Its Application to Control Nanoparticle Aggregation in Colloidal Systems: A Review. *Micromachines* [online]. 2023, **15**(1), 24. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi15010024

[74] WANG, Shi-Bin, Ai-Zheng CHEN, Lian-Jin WENG, Mei-Ying CHEN a Xiao-Lin XIE. Effect of Drug-loading Methods on Drug Load, Encapsulation Efficiency and Release Properties of Alginate/Poly-L-Arginine/Chitosan Ternary Complex Microcapsules. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2004, **4**(1), 27–30. ISSN 1616-5195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200300043

[75] ZATORSKA, Maria, Grzegorz ŁAZARSKI, Urszula MAZIARZ, Natalia WILKOSZ, Tomoko HONDA, Shin-ichi YUSA, Jan BEDNAR, Dorota JAMRÓZ a Mariusz KEPCZYNSKI. Drug-loading capacity of polylactide-based micro- and nanoparticles – Experimental and molecular modeling study. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, **591**, 120031. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120031

[76] PENG, Zhili, Shanghao LI, Xu HAN, Abdulrahman O. AL-YOUBI, Abdulaziz S. BASHAMMAKH, Mohammad S. EL-SHAHAWI a Roger M. LEBLANC. Determination of the composition, encapsulation efficiency and loading capacity in protein drug delivery systems using circular dichroism spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **937**, 113–118. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.08.014

[77] JACKSON, John K, Christopher M. K SPRINGATE, William L HUNTER a Helen M BURT. Neutrophil activation by plasma opsonized polymeric microspheres: inhibitory effect of Pluronic F127. *Biomaterials* [online]. 2000, **21**(14), 1483–1491. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00034-X

[78] COMMISSIONER, Office of the. Nanotechnology Fact Sheet. *FDA* [online]. 2018 [vid. 2024-11-16]. Dostupné z: https://www.fda.gov/science-research/nanotechnology-programs-fda/nanotechnology-fact-sheet

[79] 欧州委員会. COMMISSION TECOMMENDATION on the definition of nanomaterial. *http://eur-lex.europa.eu/LexUreServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:EN:PDF* [online]. nedatováno [vid. 2024-11-16]. Dostupné z: https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698599229114624?lang=en

[80] TAGHIPOUR, B., M. YAKHCHALI, I. HARIRIAN, A.M. TAMADDON a S. Mohammadi SAMANI. The effects of technical and compositional variables on the size and release profile of bovine serum albumin from PLGA based particulate systems. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014, **9**(6), 407–420. ISSN 1735-5362.

[81] MCCALL, Rebecca L. a Rachael W. SIRIANNI. PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E-TPGS. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* [online]. 2013, (82), 51015. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/51015

[82] BUDHIAN, Avinash, Steven J. SIEGEL a Karen I. WINEY. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2007, **336**(2), 367–375. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.061

[83] WATCHARADULYARAT, Natsorn, Monthira RATTANATAYAROM, Nisarat RUANGSAWASDI a Nisa PATIKARNMONTHON. PEG–PLGA nanoparticles for encapsulating ciprofloxacin. *Scientific Reports* [online]. 2023, **13**(1), 266. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-023-27500-y

[84] FECZKÓ, Tivadar, Judit TÓTH a János GYENIS. Comparison of the preparation of PLGA–BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2008, **319**(1), Colloids and Interfaces for Nanoscience and Nanotechnology Selected papers from the 20th European Colloid and Interface Society (ECIS) Conference jointly organized with 18th European Chemistry at Interfaces Conference (ECIC) held on 17-22 September, 2006 in Budapest, Hungary, 188–195. ISSN 0927-7757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2007.07.011

[85] CORTÉS, Hernán, Héctor HERNÁNDEZ-PARRA, Sergio A. BERNAL-CHÁVEZ, María L. Del PRADO-AUDELO, Isaac H. CABALLERO-FLORÁN, Fabiola V. BORBOLLA-JIMÉNEZ, Maykel GONZÁLEZ-TORRES, Jonathan J. MAGAÑA a Gerardo LEYVA-GÓMEZ. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials* [online]. 2021, **14**(12), 3197. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14123197