

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici

Bc. Alexandra Bolková

Diplomová práce

2021

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Preparation of chitosan particles with proteins for mucosal administration

Bc. Alexandra Bolková

Thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alexandra Bolková**
Osobní číslo: **C18479**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Využití polymerních částic a nanočástic v medicíně a farmacii, metody přípravy a charakterizace. Podání látek na sliznici, slizniční vakcíny a jejich vlastnosti. Současné slizniční vakcíny – virové, bakteriální, parazitární. Adjuvans. Řízené uvolňování látek.

Experimentální část:

Cílem bude připravit bioaktivní polymerní nosič s modelovým proteinem s výhodami nanomateriálů, jako je vysoká účinnost drug delivery systému, ověřená stabilita a ověřené množství vázané látky.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Odborná literatura mladší 10 let.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

PROHLAŠUJI:

Práci s názvem Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. května 2021

Bc. Alexandra Bolková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní Mgr. Marcelu Slovákové, Ph. D. z Katedry biologických a biochemických věd za cenné rady, vstřícnost, trpělivost a pomoc jak při práci v laboratoři, tak i při zpracování celé diplomové práce. Velké poděkování patří i mé rodině, která mě během celého studia podporovala.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá syntézou polymerních submikročástic a vazbou proteinu pro cílený transport léčiv na sliznici. Popisuje současný stav i perspektivu výzkumu a vývoje v oblasti polymerních systémů pro řízené uvolňování a cílený transport léčivých látek formou slizniční vakcinace. Podává stručný přehled o materiálech a přídatných látkách, které se již v klinické praxi využívají. Experimentální část práce je věnována především základnímu výzkumu, a to přípravě a charakterizaci částicových systémů s využitím chitosanu a dalších polymerů, fluorescenčnímu značení chitosanu a fyzikální vazbě modelového proteinu ovalbuminu na částice se sledováním míry jeho uvolnění v čase do různých médií.

KLÍČOVÁ SLOVA

slizniční vakcína, systém pro cílený transport, chitosan, kyselina hyaluronová, ovalbumin, submikročástice

ANNOTATION

The thesis is focused on synthesis of polymeric submicroparticles and protein binding for targeted drug delivery system on the mucosa. It describes the current state and perspective of research and development in the field of polymer systems for controlled release and targeted transport of drugs in the form of mucosal vaccination. It provides a brief overview of materials and additives that are already used in clinical practice. The experimental part contains basic research, which includes the preparation and characterization of particle systems using chitosan and other polymers, fluorescent labeling of chitosan and physical binding of model protein ovalbumin to particles with monitoring of its release over time into various media.

KEYWORDS

mucosal vaccine, drug delivery system, chitosan, hyaluronic acid, ovalbumin, submicroparticles

Obsah

ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1 Podání látek na sliznici.....	16
1.1.1 Vakcinace	16
1.1.2 Typy vakcín	18
1.1.3 Slizniční povrchy	24
1.1.4 Slizniční imunitní systém	25
1.2 Slizniční vakcíny.....	31
1.2.1 Mechanismy působení slizniční vakcíny.....	32
1.2.2 Současné licencované slizniční vakcíny.....	33
1.2.3 Optimalizace podání očkovacích látek na sliznici	33
1.2.4 Složení slizničních vakcín	34
1.2.5 Intranasální vakcinace	37
1.3 Adjuvans.....	38
1.3.1 Typy adjuvans.....	39
1.4 Nanočásticové transportní systémy pro transmukózní podání látek	43
1.4.1 Nanočásticové vakcíny.....	44
1.4.2 Způsoby cíleného transportu nanočástic s léky	45
1.4.3 Vstup nanočástic do krevního řečiště.....	45
1.4.4 Vliv slizničního prostředí na vlastnosti částic	46
1.5 Polymerní nanočásticové transportéry	47
1.4.1 Syntetické polymery.....	47
1.4.2 Přírodní polymery	48
1.4.3 Aplikace lipidů v slizničních vakcínách.....	53
1.4.4 Další polymerní částicové systémy	56
1.5.1 Modifikace vlastností polymerů	58
1.6 Vlastnosti částic pro <i>in vivo</i> studie.....	59
1.6.1 Hydrodynamická velikost částic	59
1.6.2 Zeta potenciál částic	62
1.6.3 Povrchová hydrofobicita	63

1.7	Značení částic pro <i>in vivo</i> zobrazovací studie	64
1.7.1	Fluorescenční zobrazovací techniky	64
2	CÍL PRÁCE	67
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	68
3.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	68
3.2	Reagencie a chemikálie	69
3.3	Příprava chitosanových částic	70
3.4	Příprava částic z chitosanu a kyseliny hyaluronové	71
3.4.1	Příprava chitosanových částic (5 : 1)	71
3.4.2	Obalení chitosanových částic kyselinou hyaluronovou	72
3.5	Příprava částic z chitosanu a polykaprolaktonu	72
3.6	Fluorescenční značení chitosanu	73
3.7	Dialýza připravených částic	74
3.7.1	Příprava dialyzačních strívek	74
3.7.2	Dialýza	74
3.8	Charakterizace částic	75
3.8.1	Měření hydrodynamické velikosti částic	75
3.8.2	Měření zeta potenciálu částic	75
3.9	Vazba ovalbuminu na chitosanové částice karbodiimidovou metodou	76
3.10	Adsorpce ovalbuminu na chitosanové částice	77
3.11	Stanovení koncentrace proteinu bicinchoninovou metodou	77
3.11.1	Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu	78
3.11.2	Stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích metodou BCA	79
3.12	Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice a vazebná kapacita nosiče	80
3.13	<i>In vitro</i> uvolňování proteinu z částic	80
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	82
4.1	Příprava chitosanových částic	83
4.1.1	Částice z chitosanu a TPP (2 : 1) a (5 : 1)	84
4.1.2	Stabilita částic z chitosanu a TPP (2 : 1) a (5 : 1)	88

4.1.3	Částice z chitosanu a kyseliny hyaluronové	90
4.1.4	Fluorescenčně značené částice z chitosanu	92
4.1.5	Příprava částic z chitosanu a polykaprolaktonu.....	96
4.2	Souhrn připravených částic na bázi chitosanu	98
4.3	Vazba modelového proteinu na chitosanové částice.....	99
4.4	<i>In vitro</i> uvolňování ovalbuminu z částic	103
5	ZÁVĚR.....	106
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	108

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Slizniční imunitní systém a jeho organizace	25
Obrázek 2: Schematické znázornění dimerního a sekrečního IgA.....	29
Obrázek 3: Imunitní reakce při expozici nanočásticemi.....	36
Obrázek 4: Chemická struktura chitosanu	42
Obrázek 5: Schéma struktury polykaprolaktonu.	48
Obrázek 6: Schematické znázornění přípravy chitosanu z chitinu deacetylací.....	49
Obrázek 7: Schematické znázornění struktury nanočástic chitosanu a interakce s vrstvou hlenu.	50
Obrázek 8: Interakce chitosanových nanočástic s navázaným antigenem s imunitním systémem	51
Obrázek 9: Struktura kyseliny hyaluronové.....	52
Obrázek 10: Obecná struktura běžných nanometrických systémů používaných při transportu léčiv (micely, liposomy a pevné lipidové nanočástice).....	53
Obrázek 11: Makrofágy linie J774.2 a chitosanové částice značené FITC	64
Obrázek 12: Reakční mechanismus mezi FITC a chitosanem	93

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Reakční mechanismus mezi FITC a chitosanem	65
Rovnice 2: Výpočet účinnosti adsorpce v procentech.	80
Rovnice 3: Výpočet vazebné kapacity nosiče v procentech.	80
Rovnice 4: Výpočet množství uvolněného ovalbuminu v procentech.	81

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání slizničních vstupních cest.	31
Tabulka 2: Výhody nasální vakcinace oproti perorální vakcinaci.....	37
Tabulka 3: Výhody a nevýhody liposomů.....	55
Tabulka 4: Příprava kalibrační řady pro metodu BCA.	78
Tabulka 5: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (2 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2.....	85
Tabulka 6: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5.....	86
Tabulka 7: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (5 : 1) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C.....	87
Tabulka 8: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených CS-TPP částic (2 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2.....	88
Tabulka 9: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených částic CS-TPP (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5.....	89
Tabulka 10: Průměrná hodnota hydrodynamické velikosti a PDI CS-TPP částic (5 : 1) po obalení do kyseliny hyaluronové.....	90
Tabulka 11: Průměrná hodnota zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených částic CS-TPP (5 : 1) po obalení do kyseliny hyaluronové.....	91
Tabulka 12: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI FITC-CS-TPP (5 : 1) částic po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5.....	93
Tabulka 13: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5.	94
Tabulka 14: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI FITC-CS-TPP částic (5 : 1) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C.	95
Tabulka 15: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI PCL/CS částic po přípravě a po dialýze do prostředí deionizované vody.....	96
Tabulka 16: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených PCL/CS částic.....	97
Tabulka 17: Souhrnná tabulka průměrných hydrodynamických velikostí, PDI a zeta potenciálu připravených částic CS-TPP (2 : 1), CS-TPP (5 : 1), FITC-CS-TPP, HA/CS-TPP a PCL/CS.....	98
Tabulka 18: Stanovení koncentrace ovalbuminu na CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částicích reprodukováno účinností sorpce nepřímou detekcí metodou BCA a výpočet sorpční kapacity nosiče vztažené na 4 mg částic.....	101
Tabulka 19: Stanovení koncentrace ovalbuminu a účinnosti vazby kovalentně vázaného na CS-TPP (2 : 1) částicích metodou BCA.....	102

SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A ZKRATEK

AFM	mikroskopie atomárních sil, <i>atomic force microscopy</i>
APC	antigen prezentující buňka, <i>antigen-presenting cell</i>
BALT	lymfoidní tkáň v plicích a průduškách, <i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCA metoda	bicinchoninová metoda, <i>bicinchoninic acid assay</i>
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát, <i>cyclic-adenosine-monophosphate</i>
CD	diferenciační skupina, <i>cluster of differentiation</i>
CFA	kompletní Freundovo adjuvans
CLR	receptory C-lektinového typu, <i>C-type lectin-like receptor</i>
CS	chitosan
CTB	netoxická B podjednotka toxinu cholery
CTL	cytotoxické T lymfocyty, <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DC	dendritické buňky, <i>dendritic cells</i>
DLS	dynamický rozptyl světla, <i>dynamic light scattering</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAE	epitel asociovaný s folikuly, <i>follicle-associated epithelium</i>
FITC	fluorescein isothiokyanát, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FLT3	ligand tyrosinkinázy 3 podobný FMS, <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
GALT	gastrointestinální imunitní systém, <i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GIT	gastrointestinální trakt
GlcN	2-amino-2-deoxy-glukopyranóza
GlcNAc	2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranóza
HA	kyselina hyaluronová, <i>hyaluronic acid</i>
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti, <i>human immunodeficiency virus</i>
IEL	intraepiteliální lymfocyty
IgA (M, G, E)	imunoglobulin A (M, G, E)

IL-1 – 33	interleukin-1– 33
ILC	přirozené lymfoidní buňky, <i>innate lymphoid cells</i>
INF- γ	interferon gamma
ISCOMS	imunostimulační komplexy, <i>immune stimulating complexes</i>
MALT	slizniční imunitní systém, <i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
NALT	lymfoidní tkáň asociovaná s nosní sliznicí, <i>nasal-associated lymphoid tissue</i>
NK	přirození zabíječi, <i>natural killers</i>
NLR	NOD like receptory, <i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NP(s)	nanočástice, <i>nanoparticles</i>
OVA	ovalbumin
PAMPs	molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenů, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem, <i>phosphate buffered saline</i>
PCL	polykaprolakton
PDI	polydisperzní index
PEG	polyethylenglykol
PGA	kyselina polyglykolová
PLGA	kopolymer kyseliny glykolové a D,L-mléčné
PRRs	receptory rozeznávající molekulové vzory, <i>pattern recognition receptors</i>
RNA	ribonukleová kyselina, <i>ribonucleic acid</i>
SC	sekreční složky, <i>secretory component</i>
SEM	skenovací elektronová mikroskopie, <i>scanning electron microscope</i>
TBC	tuberkulóza
TEM	transmisní elektronová mikroskopie, <i>transmission electron microscopy</i>
TGF- β	transformující růstový faktor, <i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	teploty fázových přechodů, <i>transition temperatures</i>
TPP	tripolyfosfát sodný
UZ	ultrazvuk
WHO	Světová zdravotnická organizace, <i>World Health Organization</i>

ÚVOD

Aplikace nanotechnologií v medicíně (tj. nanomedicíně) má potenciál výrazně zlepšit lékařské postupy jak při léčbě, tak při diagnostice nemocí. Potenciální použití polymerních nanočástic jako nosičů léčiv vedlo k vývoji mnoha různých koloidních nosičů. Hlavní výhody těchto systémů spočívají v jejich schopnosti prostupovat biologickými bariérami, ochraně makromolekul (tj. peptidů, proteinů, oligonukleotidů a genů) před degradací v biologických médiích a doručovat léky nebo makromolekuly na cílové místo s následnou kontrolou jejich uvolnění. Nanočástice (NP) se dají využít jako transportní systémy a jejich použití se stalo dobře zavedenou strategií k překonání několika omezení terapeutik. Velmi často však korelace mezi chováním NP *in vitro* a *in vivo* omezuje klinické aplikace. Polymerní nanočástice vyrobené z přírodních a syntetických polymerů získaly velkou pozornost díky své stabilitě a snadné modifikaci povrchu. Mají významnou roli v cíleném transportu léčiv. Protože se nanomateriály používají v kontaktu s lidským tělem a jsou často exponovány do krve, musí splňovat kritéria biologické/hemokompatibility. Tato kritéria jsou však komplikována povrchovou dynamikou nanomateriálů. Z důvodu nutné biokompatibility lze k přípravě biologicky rozložitelných materiálů použít velmi omezený počet polymerů. Nanomateriály mohou ovlivnit specifitu, bezpečnost a účinnost aktivního léčiva. Unikátní jsou nejen díky subcelulární velikosti, ale také protože jsou biodegradabilní a biokompatibilní. Výhodou je možnost přípravy selektivních nanočástic, které jsou schopny kontrolovaně, dlouhodobě a lokálně uvolňovat léčivo, tedy možnost cílené distribuce léčiv a jejich řízené uvolňování. Dochází také ke zmírnění nežádoucích účinků a tím pádem i zvýšení terapeutické účinnosti léčiv. K léčbě je navíc za potřeby nižší množství účinné látky.

Tato diplomová práce se zabývá obecnou definicí a charakterizací vakcín, typy vakcín se zaměřením na slizniční vakcíny, přídatným pomocným látkám (adjuvans) a částicovým vakcínám. Velká část experimentální práce je věnována přípravě a charakterizaci částicových systémů s využitím chitosanu a dalších polymerů, za účelem nalezení vhodného transportního systému s vysokou účinností, stabilitou a s pomalým uvolňováním proteinu. Dále se práce věnuje fluorescenčnímu značení chitosanu a následné tvorbě částic pro sledování vlivu značeného chitosanu na velikost vytvořených částic a vlivu skladování na jejich velikost. Pro zjištění vlastností chitosanové částicové vakcíny jsou částice použity pro vazbu modelového proteinu ovalbuminu a sledování míry uvolnění ovalbuminu v čase do médií s různým pH.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Podání látek na sliznici

Kontakt organismu s vnějším prostředím se odehrává především na povrchu sliznic a kůže. Zatímco kožní povrch je mechanicky chráněn několikavrstevným epitelem, řádově mnohonásobně větší povrch sliznic zažívacího, dýchacího a urogenitálního traktu, oční spojivky a vývodů exokrinních žláz, je většinou (s několika výjimkami) kryt jednovrstevným epitelem. Sliznice pokrývá oblast, která je asi 200krát větší než oblast pokrytá kůží [1]. Kontaktní povrch s vnějším prostředím je zprostředkován sliznicí v rozsahu přibližně 400 m². Tato prostorově rozměrná oblast není tak odolná vůči průniku patogenů jako kůže, neboť je často omezena tenkou vrstvou epitelu bez keratinizace [2]. Globálně jsou infekce spojené s prostupem přes sliznici (např. tuberkulóza, chřipka, průjemová onemocnění, pneumonie, žaludeční vředy a pohlavně přenosná onemocnění) hlavními příčinami nemocí a představují velké socio-ekonomické zatížení [3].

1.1.1 Vakcinace

Vakcinace je jedním z největších úspěchů moderní medicíny [4]. To nejlépe dokládá skutečnost, že od zavedení vakcinační strategie a jejího univerzálního použití u dětí, došlo k 90 až 100% poklesu úmrtnosti a nemocnosti u několika dětských infekcí [5]. Vývoj, výroba, kontrola a klinické hodnocení vakcín je interdisciplinárním prolnutím mezi virology, bakteriologi, molekulárními biology, imunology, biotechnologi a farmaceutickými technologi. Vakcíny pro více než 30 virových a bakteriálních patogenních agens v průběhu let zachránily miliony lidí. Přesto byly některé patogeny (jako je HIV, malárie a lidský respirační syncytiální virus) rezistentní vůči intenzivním pokusům o vývoj vakcíny. Soudobé vakcíny proti celosvětově ohrožujícím chorobám (jako je TBC a chřipka), jsou suboptimální, což vede k potenciální pandemicitě těchto onemocnění [6].

Účelem vakcinace je vyvolat dlouhodobou ochrannou imunitu před infekcí způsobenou patogeny a předcházet klinicky významným infekčním onemocněním [7]. Vakcinace je nejúspěšnější a nejúčinnější metodou prevence a eradikace infekčních chorob [5]. I přes úspěšné klinické používání klasických injekčně podávaných vakcín, jsou vyvíjeny nové, účinnější vakcinační strategie (jako je vývoj nových nosičů vakcín a snaha o aplikaci vakcín neinvazivními metodami). Použití nanočástic pro cílený transport léčiv slizniční cestou má velký potenciál, díky možné stimulaci silných a dlouhotrvajících systémových i slizničních imunitních odpovědí [4].

1.1.1.1 Imunologická paměť

Cílem vakcinačních strategií je vyvolat dlouhodobou imunologickou paměť na ochranu před reinfekcí. Což je schopnost adaptivního imunitního systému si zapamatovat antigeny, které jej dříve aktivovaly, a v případě dalšího setkání se stejným antigenem, zahájit intenzivnější imunitní reakci [8]. Při aplikování první vakcíny se vytváří primární imunitní odpověď. Po určité době se očkování opakuje jako tzv. booster (posilovací) dávka, která opět indukuje nejen humorální či buněčnou aktivní imunitní odpověď, ale současně i imunologickou paměť. Imunologická paměť je definována perzistencí specifických lymfocytů a plazmatických buněk produkujících vysoce afinitní protilátky specifické pro určitý patogen, spíše než perzistencí antigenu k vyvolání kontinuální aktivace lymfocytů [9].

Imunologická paměť závisí na klonální selekci. B lymfocyty mohou antigen rozpoznat podle membránové protilátky, která se specificky váže na antigen. Mohou být aktivovány k rychlé expanzi, přičemž jejich klony se diferencují na plazmatické buňky a paměťové B lymfocyty se stejnou specificitou k antigenu. Plazmatické buňky vylučují velké množství protilátek k neutralizaci antigenů. Kvůli krátké životnosti plazmatické buňky po clearanci antigenů rychle odumírají, oproti tomu paměťové buňky mají dlouhou životnost a zůstávají v těle. V případě dalšího setkání s již „známým“ antigenem se rychle mobilizují a diferencují v plazmatické buňky, které produkují nadměrné množství protilátek a zahájí silnější reakci na obranu proti antigenu za kratší časový interval [8].

1.1.1.2 Cesty aplikace vakcíny

Každá cesta podání látek na sliznici má své vlastní charakteristiky a je třeba zvážit rovnováhu mezi klady a zápory každé vakcíny, s přihlédnutím k patogenu, proti kterému je zacílena. Vakcíny byly během historie aplikovány řadou cest [5]. Nejčastější aplikací je injekční podání – intramuskulární nebo intradermální. Ačkoliv je injekční vakcinace nejvíce rozšířená, má řadu nevýhod (např. potřeba vyškoleného zdravotnického personálu, bolestivý vpich či komplikace při skladování) [10]. Vedle toho se využívá i transdermálních náplastí a intranazálních přípravků. Většina patogenů iniciuje své infekční procesy na slizničních površích (jako jsou gastrointestinální, genitourinární a dýchací cesty), existuje snaha o vývoj slizničních vakcín, které budou efektivnější a imunologicky dominantnější ve srovnání s parenterálním podáním. Kromě toho by mohly slizniční vakcíny snižovat náklady, vedlejší účinky a riziko přenosu infekcí přenášených krví prostřednictvím kontaminovaných injekčních jehel, nemluvě o jejich bezbolestné aplikaci [5].

1.1.2 Typy vakcín

Existuje několik typů vakcinačních látek. Každý typ je navržen tak, aby přesně zacílil na imunitní systém. Jednou z nejstarších vakcín jsou živé vakcíny, tj. oslabené varianty cílového patogenu. Stále více se ale uplatňovaly postupy biotechnologie, molekulární biologie a genetiky, a ty daly vzniknout novým druhům, mnohem bezpečnějších vakcín, jako jsou rekombinantní či DNA vakcíny [10]. Neživé vakcínové antigeny, zejména purifikované nebo rekombinantní subjednotkové vakcíny, jsou často slabě imunogenní a vyžadují další složky, které pomáhají stimulovat ochrannou imunitní odpověď na základě protilátek a funkcí efektorových T lymfocytů. Tyto aditivní pomocné látky (adjuvans) zvyšují imunogenicitu vakcinačních antigenů [11]. U každé vakcíny je důležité zvážit její reaktivitu a imunogenitu. Reaktivita je schopnost vakcíny vyvolat i nežádoucí odezvu organismu (horečka, obstipace, febrilní křeče, bolest či anafylaktický šok) [12].

1.1.2.1 Živé oslabené (atenuované) vakcíny

Atenuované vakcíny obsahují kmeny bakterií či virů pasážovaných na kultivačních médiích, jež ztrácí svoji patogenitu při zachování své antigenní struktury. K deaktivaci mikroorganismů se využívají chemické (formaldehyd, saponiny, hydroxid sodný, fenol) či fyzikální (UV záření, teplota) inaktivace. Tyto mikroorganismy se stávají méně patogenními než skutečný patogen, ale je u nich zachována schopnost vyvolat tvorbu protilátek [11]. Technologie výroby vakcíny byla rozvinuta v 50. letech 20. století a dnes již není v mnoha případech z důvodu bezpečnosti využívána. Cílem atenuované vakcíny je vyvolat sekreční a systémovou imunitní odpověď, která je podobná imunitní odpovědi pozorované po prodělání přirozené infekce [13]. Pouze 1 nebo 2 dávky většiny živých vakcín mohou poskytnout celoživotní ochranu před patogeny a chorobami jimi způsobenými. Živé vakcíny mají řadu nevýhod, jako rizikovost pro lidi s oslabeným imunitním systémem, pro dlouhodobě nemocné či pro pacienty, kteří podstoupili transplantaci orgánů [14]. Zároveň se také musí skladovat chlazené, a nejsou tak příliš vhodné pro transport. To znamená, že je nelze použít v zemích s omezeným přístupem k chladicím zařízením. Historicky se atenuované vakcíny využívaly k produkci vakcín nejčastěji z viru spalniček (morbiliviru), rotavirů, polioviru, paramyxovirů a flavivirů. V současné době existuje celkem pět vakcín, které doporučuje Světová zdravotnická organizace (WHO). Jedná se o bakteriální vakcínu proti *Mycobacterium tuberculosis* (původce tuberkulózy) a virové vakcíny (jako je vakcína proti rubeole, rotaviru, poliomyelitidě a žluté zimnici) [15].

1.1.2.2 Inaktivované (usmrcené) vakcíny

Inaktivované vakcíny sestávají z celých inaktivovaných agens (jako je celobuněčná vakcína proti dávivému kašli a inaktivovaná vakcína proti dětské obrně), nebo obsahují specifické složky odvozené z patogenu fyzikálními (UV záření, teplota, zvýšený tlak), chemickými (kyselina askorbová, β -aminofenylketon, formaldehydu, fenolu) nebo biologickými prostředky [13]. Tyto mikroorganismy ztrácejí schopnost reprodukce v hostiteli, ale jejich povrchové antigeny zůstávají nepoškozeny. Inaktivované vakcíny obvykle neposkytují imunitní ochranu, která je tak účinná, jako v případě použití živé vakcíny. Většinou jsou tedy nutné opakované, tzv. „booster“ dávky, k získání požadované dlouhodobé imunity. V humánní medicíně WHO v současné době doporučuje inaktivovanou vakcínu proti poliomyelitidě a proti dávivému kašli. Ke klinickým účelům se využívají například i vakcíny proti HIV, chřipce či proti hepatitidě B a C [16].

1.1.2.3 Toxoidové vakcíny (anatoxiny)

Toxoidové vakcíny jsou cíleny proti konkrétním bakteriálním toxinům. Některá bakteriální onemocnění nejsou přímo způsobena bakterií samotnou, ale toxinem (většinou exotoxinem) produkovaným touto bakterií. Toxoidy jsou proteinové toxiny chemicky modifikované za účelem snížení patogenity. Toxicita purifikovaných exotoxinů může být potlačena nebo inaktivována buď teplem nebo formaldehydem (při zachování imunogenicity) za vzniku toxoidů. Mohou být tekuté, purifikované, vysrážené či adsorbované na příslušný sorbent [17]. Očkování toxoidy indukuje anti-toxoidní protilátky, které jsou schopné vázat se na toxin a neutralizovat jeho škodlivé účinky. Imunitní systém tedy produkuje protilátky, které opsonizují bakteriální toxiny. Postupy výroby toxoidních vakcín jsou přísně kontrolovány, aby se dosáhlo detoxikace/inaktivace bez nadměrné modifikace struktury antigenního epitopu. K zajištění spolehlivé imunizace je žádoucí ve stanovených intervalech přeočkovávat. Mezi onemocnění způsobená bakteriálním toxinem patří tetanus, jehož příznaky nejsou způsobeny bakterií *Clostridium tetani*, ale neurotoxinem – tetanospasminem. Dále WHO doporučuje vakcinaci proti záškrtu či botulismu [18].

1.1.2.4 Vakcíny na bázi nukleových kyselin

Jedná se o rekombinantní technologii, ve které je za terapeutický efekt zodpovědná nativní DNA. Vakcíny na bázi nukleových kyselin (DNA či RNA vakcína) zahrnují začlenění genetického materiálu kódujícího specifické proteiny (antigeny) infekčního agens nebo antigeny, vůči nimž se hledá imunitní odpověď [19].

RNA vakcíny se skládají z nukleové kyseliny RNA, která kóduje geny antigenu infekčního agens. V současné době existují dva různé typy syntetických RNA vakcín: konvenční mRNA a samoamplifikující RNA (saRNA). Začlenění chemicky modifikovaných nukleotidů, optimalizace sekvencí a různé strategie purifikace zlepšují účinnost translace mRNA a snižují vnitřní imunogenní vlastnosti. Exprese antigenu je úměrná počtu konvenčních transkriptů mRNA úspěšně doručených během vakcinace. Dosažení adekvátní exprese pro ochranu nebo imunomodulaci tedy může vyžadovat velké dávky nebo opakovaná podání. Toto omezení řeší vakcíny saRNA, které jsou geneticky upravenými replikony odvozenými od samoreplikujících se jednovláknových RNA virů. Mohou být dodávány jako virové replikonové částice s saRNA zabalenou do virové částice nebo jako zcela syntetické saRNA produkované po transkripci *in vitro* [20].

DNA vakcína funguje na principu transfekce specifické antigenní DNA kódující sekvenci v buňkách imunizovaného druhu. Tato vakcína obsahuje nativní plazmidovou DNA, tj. DNA bez jakéhokoli přidruženého lipidu, proteinu nebo sacharidu, s cílem vyvolat imunitní odpověď. Tento plazmid je následně absorbován buňkami, jejichž normální metabolické procesy syntetizují proteiny na základě genetického kódu v plazmidu, který absorbují. Vlastní buňky těla použijí tento genetický materiál k produkci antigenů [21]. Plasmidy mohou nést i geny kódující vylučování i jiných látek (jako jsou cytokiny), případně i jiných molekul s imunostimulačním efektem. DNA vakcína sestává z plazmidu obsahujícího: 1) počátek replikace např. *Escherichia coli* pro amplifikaci plazmidu; 2) silný promotor (obvykle z cytomegaloviru); 3) více klonovacích míst, do kterých lze vložit gen, který má být exprimován a 4) antibiotikum jako selekční marker. Aby DNA vakcína úspěšně indukovala imunitní odpověď, musí plazmid vstoupit do buňky, v jádře být transkribován s následnou produkcí cytoplazmatického proteinu. Možné výhody tohoto přístupu zahrnují stimulaci dlouhodobé imunitní odpovědi, vynikající stabilitu vakcíny, relativní snadnost výroby vakcíny ve velkém měřítku a nemutagení charakter [19]. Ve srovnání s konvenčními vakcínami založenými na proteinech/peptidech, které mají indukovat antigenově specifické adaptivní imunitní reakce, jsou DNA vakcíny stabilnější, nákladově efektivnější, snadno

se vyrábějí a je s nimi bezpečnější zacházení. Naopak, hlavním nedostatkem DNA vakcín je však jejich špatná imunogenicita při intramuskulárním podání [6]. Vakcíny DNA mohou být užitečné při virových infekcích, u nichž je pro ochrannou imunitu nezbytná indukce imunitních odpovědí zprostředkovaných cytotoxickými T lymfocyty [19]. Mechanismus DNA vakcín je nadějí pro vývoj vakcín proti onemocněním, proti kterým zatím úspěšně či trvale očkovat nelze. Některé viry (jako jsou ortomyxoviry nebo HIV) snadno mutují, což je ztěžujícím faktorem úspěšného vývoje vakcín. Použití technologie DNA může být užitečné v případě kontraindikace živé vakcíny (např. u imunologicky ohrožených jedinců) [6]. Stejně jako u živé či rekombinantní vakcíny, tak i u DNA vakcín, bylo prokázáno, že vedou k prezentaci antigenních determinant ve spojení s molekulami MHC I. třídy. Tento vakcinační přístup se jeví jako bezpečný, vakcína může být připravena rychle a stabilita DNA není ovlivněna vysokými teplotami prostředí [21]. Mnoho takových vakcín je již ve výzkumném programu, ačkoli žádná z nich není v současné době licencována pro lidské použití. DNA vakcíny jsou testovány pro různé aplikace včetně léčby rakoviny, alergií, autoimunitních a infekčních onemocnění. K dispozici je i několik DNA vakcín pro veterinární použití. Ve vývoji je řada vakcín proti HIV, chřipce, malárii, tuberkulóze a leishmanióze [19]. Ukázalo se však, že DNA vakcíny jsou méně imunogenní u primátů a lidí, i když se prokázalo, že jsou bezpečné a dobře tolerované. Pro zvýšení účinnosti těchto vakcín byly navrženy některé přístupy, které představují druhou generaci DNA vakcín: změny plazmidu, které zvyšují genovou expresi, stejně jako systémy koexprimující cytokiny nebo jiné molekuly schopné zesílit imunitní odpovědi [21].

1.1.2.5 Subjednotkové vakcíny

Subjednotkové vakcíny jsou založené na vysoce purifikovaných a dobře charakterizovaných antigenech, odvozených od příslušných patogenů. Jde o inaktivované subjednotkové vakcíny, které obsahují pouze komponenty patogenů, které jsou zodpovědné za imunogenitu [22]. Mohou být složeny z antigenních proteinů a polysacharidů nebo složek rekombinantních proteinů. Usmrcený patogen je rozložen, jeho komponenty separovány a dále použity k přípravě vakcíny. I když toto složení může učinit vakcíny bezpečnějšími a snáze výrobitelnými, často vyžaduje začlenění adjuvans, neboť samotné antigeny nestačí k vyvolání silné a dlouhodobé ochranné imunitní odpovědi [23]. Subjednotkové vakcíny jsou tedy obecně bezpečnější, ale často méně účinné než živé oslabené vakcíny, neboť postrádají nezbytné stimulační faktory [12]. Subjednotkové vakcíny a proteinové vakcíny nejsou účinné při indukci

odpovědi slizničních cytotoxických T lymfocytů (CTL) v důsledku bariér, které brání úspěšnému dodávání buněk MHC I. třídy do cytoplazmy [23]. Úspěšné vakcinace lze dosáhnout izolací specifického proteinu z patogenu a jeho prezentací jako samotného antigenu. Subjednotkové vakcíny se dělí podle obsahu komponent na **proteinové, konjugované a polysacharidové**. V současné době se používají jak proti bakteriím, tak proti virům [12].

Konjugované vakcíny kombinují slabý antigen se silným antigenem jako nosičem, takže si imunitní systém vytvoří silnější odpověď na slabý antigen [24]. Konjugované vakcíny jsou zacíleny proti polysacharidovým pouzdrům infekčních agens, které působí jako determinanty virulence. Polysacharidové obaly jsou dlouhé polymery skládající se z mnoha opakujících se sacharidových jednotek, jejichž chemická povaha definuje kapsulární typ organismu [22]. Pro mnoho bakterií slouží tyto kapsulární polysacharidy jako ochranná vnější vrstva. Bakterie mohou syntetizovat stovky chemicky a imunologicky odlišných polysacharidů. Například existuje 91 různých polysacharidů (sérotypů) spojených s pneumokoky a 13 polysacharidů spojených s meningokoky (ačkoli pouze 5 séro skupin meningokokových polysacharidů – A, B, C, Y a W135 – obvykle způsobuje onemocnění) [25]. Tyto vakcíny většinou obsahují T-independentní polysacharidový antigen konjugovaný s imunogenním proteinem [26]. Bakterie s polysacharidovými pouzdry, jako je *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok), *Haemophilus influenzae* typu B a *Neisseria meningitidis* (meningokok) či *Shigella*, jsou hlavními příčinami závažných bakteriálních infekcí u malých dětí [27].

Polysacharidové vakcíny jsou složeny z dlouhých řetězců molekul sacharidů, které tvoří povrchové obaly bakterií. Imunitní odpověď na polysacharidovou vakcínu je nezávislá na T lymfocytech, avšak stimuluje B lymfocyty (tedy bez asistence Th lymfocytů). To vede k typově specifické produkci protilátek, která zvyšuje vychytávání a likvidování patogenů fagocyty. Tyto vakcíny jsou cílené na hemofilové, meningokokové a pneumokokové infekce. Antigeny nezávislé na T lymfocytech, včetně polysacharidových vakcín, nejsou trvale imunogenní u dětí mladších 2 let. Imunitní systém malých dětí důsledně nereaguje na polysacharidové antigeny (pravděpodobně kvůli jeho nezralosti). Protilátky indukované polysacharidovými vakcínami mají nižší funkční aktivitu, než je aktivita indukovaná proteinovými antigeny, neboť převládajícími protilátkami produkovanými v reakci na většinu polysacharidových vakcín, jsou IgM. Protilátky typu IgG jsou produkovány v menší koncentraci [28].

1.1.2.6 Rekombinantní (vektorové) vakcíny

Rekombinantní (vektorové) vakcíny využívají metody genového inženýrství. Rekombinantní proteinové vakcíny vznikají na principu vložení segmentu DNA kódujícího antigenní determinanty (např. bakteriální povrchový protein) do jiného „neškodného“ viru/kvasinky/bakterie k vyvolání produkce antigenního patogenu [29]. Při pomnožení „nosičového“ viru nebo při metabolizaci produkční buňky, dojde současně i k exprimování rekombinantního proteinu, který je následně purifikován [12]. Imunitní systém rozpozná exprimovaný protein a poskytne tak budoucí ochranu před cílovým patogenem. I přesto, že vakcíny založené na rekombinantních proteinech nabízejí ve srovnání s tradičními vakcínami několik výhod (bezpečnost a nižší výrobní náklady), většina z nich vykazuje slabou nebo špatnou imunogenicitu, jsou-li podávány samostatně. Vyžadují proto použití adjuvans k vyvolání dlouhodobé imunitní ochrany. Rekombinantní vakcíny se používají například proti papilomavirovým nákazám či hepatitidě B [30]. Je také možné vytvořit živé rekombinantní vektorové vakcíny schopné dodávat heterologní antigeny zavedením genů kódujících antigen. Myšlenkou tohoto přístupu je využití imunologických vlastností živého vektoru k vyvolání imunitní odpovědi proti jeho vlastním proteinům i vůči prezentovanému heterolognímu proteinu. Obecně platí, že tyto přístupy mají výhody, které jsou vlastní samotnému patogenu, jako je napodobování přirozené infekce, jejich schopnost stimulovat podskupiny T lymfocytů CD 4+ a CD 8+ a v některých případech možnost orálního aplikace [29]. Před výběrem systému pro expresi antigenu je třeba vzít v úvahu několik faktorů, které mohou interferovat s účinností rekombinantních vakcín. Jedním z faktorů je úroveň exprese získaná použitím konkrétního expresního vektoru a promotoru, výběr selekčního markeru či přítomnost nebo nepřítomnost posttranslačních modifikací rekombinantního vektoru. Z komerčních vakcín se dnes využívá rekombinantní vakcína proti hepatitidě B či proti humánnímu papilomaviru [12].

1.1.2.7 Autologní vakcíny (autovakcíny)

Autovakcíny se připravují izolací mikroorganismů přímo od infikovaných jedinců (např. z abscesu, sputa, moči, hnisu...). Používají se na jejich následnou léčbu k vytvoření imunity proti konkrétnímu infekčnímu patogenu. Konkrétní infekční agens je nejprve identifikováno, kultivováno a následně inaktivováno (buď chemickými látkami nebo teplem). Jako základní koncept v mikrobiologické terapii se tyto autovakcíny používají zejména k léčbě chronických zánětlivých poruch spojených s narušenými imunitními reakcemi rezistentními vůči standardní terapeutické léčbě. Příkladem může být např. izolace *E. coli* ze stolice postižené osoby podle

vysoce standardizovaného postupu. V podstatě se nejedná o očkování v pravém slova smyslu, ale o imunostimulaci. Mezi nejčastěji izolované patogeny se řadí *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida sp.*, atd. [31]. Autovakcíny se připravují nejčastěji v případě opakujících se infekcí močových cest (způsobených *E. coli* nebo jinými Gram negativními tyčinkami), akné (*Propionibacterium spp.*) a vaginální kandidózy [32].

1.1.3 Slizniční povrchy

Slizniční povrchy jsou chráněny před vnějšími vlivy fyzikálně-chemickými obrannými mechanismy a vrozeným (nespecifickým) a specifickým specializovaným slizničním imunitním systémem [1]. Nejdůležitější součástí okamžité obrany proti patogenům na sliznici je vrozený imunitní systém [2]. Většina vnějších slizničních povrchů je složena z organizovaných folikulů a rozptýlených antigen-reaktivních nebo senzibilizovaných lymfoidních buněk, včetně B lymfocytů, T lymfocytů, podmnožin T lymfocytů, plazmatických buněk a množství dalších buněčných složek zapojených do indukce a udržování imunitní odpovědi. Sliznice a přidružená lymfoidní tkáň jsou atraktivním cílem pro vakcinační strategie, neboť zde začínají počáteční fáze infekce [6]. Sliznice představují hlavní vstup pro většinu infekčních agens, ale také pro neškodné antigeny pocházející z požitých potravin, vzdušných látek či z komenzálních bakterií [33].

Slizniční povrchy poskytují několik „vrstev“ bariéry, kterou musí potenciální patogeny proniknout před zahájením vzniku infekce. Za prvé, jsou vylučovány tělesné tekutiny a hlen, které obsahují lymfocyty (např. makrofágy). Intraepiteliální lymfocyty (IEL) se nacházejí těsně pod epiteliálním povrchem. Dále hlouběji pod bazální membránou se vyskytuje vrstva mononukleárních buněk nazývaná „*lamina propria*“ [34]. Tyto imunokompetentní buňky tvoří primární řadu buněčné imunity a jsou připraveny bojovat proti potenciálním patogenům, které se přiblížily k povrchu sliznice nebo pronikly do mukózní bariéry. Cizí antigeny mohou být na slizničních površích vycitávány specializovanými membránovými epitelovými buňkami (M-buňkami) a aktivně přenášeny do sousedních organizovaných lymfatických folikulů [35]. Součástí sliznice je velké množství imunitních buněk. Funkce sliznice závisí na interakci a komunikaci epiteliálních a stromálních buněk s tkáňově-rezidentními buňkami jako jsou makrofágy a přirozené lymfoidní buňky (ILC). Tkáňově-rezidentní buňky jsou zodpovědné za bariérové funkce, remodelaci tkání a homeostázu. ILC pocházejí z lymfoidního progenitoru a tvoří funkční a fenotypovou paralelu k T lymfocytům. ILC se hojně

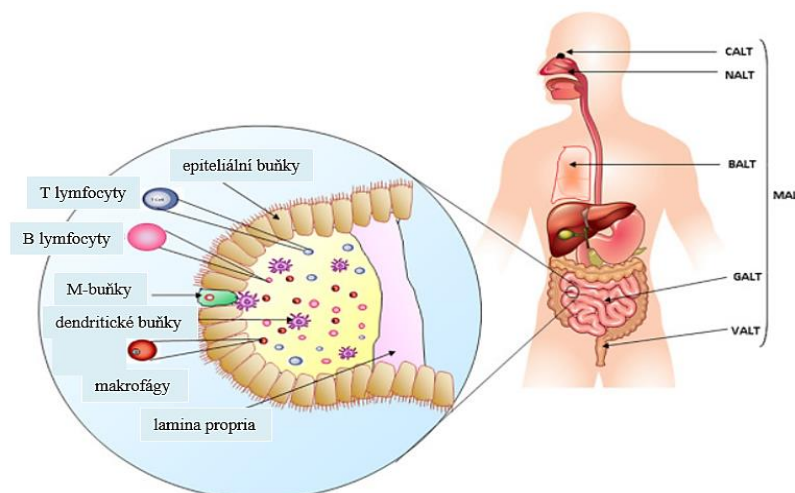
vyskytují na slizničních površích plic či střev. Přestože je jejich funkce celkově prospěšná, je známo, že jejich dysregulace přispívá k patologii zánětů a chorob [36].

Lamina propria a IEL se skládají převážně z klidových paměťových T lymfocytů, ale zahrnují i B lymfocyty, přirozené zabíječské buňky (NK buňky), makrofágy a dendritické buňky. Značná část T lymfocytů přítomných na sliznici exprimuje receptor $\gamma\delta$ T lymfocytů a podílí se na poskytování imunitní tolerance [1]. Na rozdíl od podskupiny $\alpha\beta$ buněk T lymfocytů, $\gamma\delta$ receptor není závislý na thymu. Lymfocyty jsou vedeny na sliznici chemotaktickými složkami (chemokiny) a interakcí selektinů/integrinů na lymfocytech a adresinech na lokálních endoteliálních buňkách. Produkce a exprese aktivních „homingových“ faktorů (selektiny a adresiny) jsou lymfocyty a tkáněmi omezeny. Také adhezní molekuly v lokální tkáni a lymfocytech jsou důležité při určování lokalizace a distribuce lymfocytů ve sliznici [37].

Antigeně specifické protilátky produkované plazmatickými buňkami jsou na základě signálů sekretovány na slizniční povrchy jako sekreční IgA (sIgA), které mohou vázat, neutralizovat a eliminovat patogeny z těla. Vzhledem k tomu, že sIgA je první obrannou linií proti cizorodým patogenům, je indukce vyvolání silné IgA odpovědi nezbytným předpokladem pro úspěšnost slizniční vakcíny [38]. Při absenci sérových protilátek se předpokládá, že IgA hrají důležitou roli při určování rezistence proti infekci [39].

1.1.4 Slizniční imunitní systém

Slizniční imunitní systém (z angl. MALT = *Mucosa-associated lymphoid tissue*) je vysoce specializovaný komplex nacházející se na povrchu sliznic s charakteristickými vlastnostmi, které ho odlišují od celkového imunitního systému (Obrázek 1) [1].



Obrázek 1: Slizniční imunitní systém a jeho organizace. Převzato a upraveno z: [41].

MALT zahrnuje místa, kde jsou naivní lymfocyty aktivovány buňkami prezentujícími antigen (APC) a efektorová místa, kde efektorové buňky (aktivované lymfocyty a vrozené imunitní buňky) lokálně kontrolují cizí agens [33]. Například lymfatická tkáň spojená s gastrointestinálním traktem (GALT) zahrnuje Peyeroovy pláty (někdy též Peyeroovy plaky, PP), mezenterické lymfatické uzliny, mandle, organizované lymfatické orgány, které jsou primárními místy indukce odpovědi střevního imunitního systému [35]. MALT se liší velikostně, organizačně a funkčně v závislosti na lokalizaci a na cílové tkáni, které slouží [33]. MALT se proto často odlišuje podskupinami, jako je lymfoidní tkáň spojená s nosní sliznicí (NALT), lymfoidní tkáň spojená s průduškami (BALT) a již zmíněný GALT. Obecně je MALT organizován stejným způsobem jako lymfatická uzlina [39].

Slizniční imunitní systém obsahuje asi 80 % imunitních buněk těla (tzn., že obsahuje asi 3/4 všech lymfocytů v těle) a dochází v nich k největší produkci imunoglobulinů, hlavně IgA. Je tak nejdůležitějším lymfatickým systémem u savců [13]. Většina buněk je přítomna v tkáních gastrointestinálního traktu (GIT), kde je na nejrozsáhlejší epitelovém povrchu organismu (tj. na střevní sliznici), přítomno největší množství imunogenních podnětů pocházejících z potravy (několik tun potravy za život) a z komensální střevní mikroflóry [1]. Za určitých podmínek je možné podáním určitých mukózních imunogenů indukovat systémový fenomén imunosuprese, nazývaný **orální tolerance** [39].

Slizniční imunitní systém může být rozdělen na **efektorové** a **induktivní mechanismy**. Induktivní mechanismy se nacházejí v oblastech, kde označení antigenu vede k počáteční aktivaci imunitních buněk, zatímco v efektorových místech mohou protilátky a buňky imunitního systému plnit svou specifickou funkci až po jejich aktivaci [40].

1.1.4.1 Efektorové mechanismy

Slizniční membrány mají tři úrovně obrany proti cizím agens, které jsou aktivovány podle nebezpečí, a to epiteliální buňky produkující hlenové a antimikrobiální nebo defenzinové faktory [1]; přirozené imunitní buňky (neutrofil, makrofágy, NK buňky, žírné buňky, dendritické buňky – DC), které jsou navázány na slizniční membrány, a mohou vyvolat okamžitou nespecifickou imunitní odpověď proti patogenům; a DC, které propojují mechanismy vrozené a specifické imunity a podílí se na zahájení specifických protiinfekčních a regulačních imunitních odpovědí [39].

1.1.4.2 Induktivní mechanismy

Antigeny na povrchu sliznice mohou být zachyceny epiteliálními buňkami nebo M-buňkami přítomnými v určitých mukózních tkáních specializovanými na vychytávání antigenů. M-buňky jsou specializované epitelové buňky, specificky umístěné v epitelu asociovaném s folikuly (FAE) v slizničních tkáních. Zachycují a transportují cizí částice přes epitelovou bariéru do diferencovaných lymfoidních buněk [42]. Transcytované částice jsou následně vychytávány B lymfocyty, aby se aktivovala sekrece sIgA (slizniční odpověď), nebo DC, které prezentují antigeny T lymfocytům, aby se zahájila produkce IgG (humorální odpověď). DC které patří mezi antigeny prezentující buňky (APC), přímo vychytávají antigeny v lumenu sliznice rozšířením jejich dendritů mezi epiteliální buňky. Tyto APC poté migrují do indukčních míst pro aktivaci naivních T lymfocytů CD 4+ a CD 8+ [37]. Vzhledem ke klíčové úloze M-buněk při dodávání antigenu přes epiteliální bariéru, jsou M-buňky nejprístupnějším cílem pro transport antigenu na slizničním povrchu k vyvolání slizniční imunity [42].

Některé antigeny mohou být prezentovány přímo IEL buňkami – intraepiteliální T lymfocyty, které jsou přítomny v savčím GIT a reprodukčním traktu. Dělí se podle toho, zda exprimují $\alpha\beta$ T buněčný receptor (TCR) nebo $\gamma\delta$ T buněčný receptor. Indukované IEL T lymfocyty (TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\beta$ +) jsou generovány z naivních T lymfocytů během imunitní odpovědi. Většina IEL T lymfocytů jsou CD 3+. Kolem 75 % všech IEL T lymfocytů exprimuje CD 8 koreceptor. Mají schopnost specificky ničit patogeny. Vykazují aktivitu podobnou NK T lymfocytům a produkují řadu cytokinů, které jsou typicky produkovány T pomocnými lymfocyty typu 1 (Th1) a Th2 [37].

Mezi parametry ovlivňující vyvolanou imunitní odpověď se řadí povaha antigenů, jejich koncentrace, biologická dostupnost, typ použitého APC a mikroprostředí. Antigenní prezentace většiny nepatogenních cizích molekul na slizniční DC vede k imunosupresi. Tento typ imunitní odpovědi je vysvětlen generováním Th2 a regulačních T lymfocytů (Treg) produkujících IL-10 nebo TGF- β . Naproti tomu antigeny a imunostimulační molekuly většiny patogenů nesou specifické molekulární znaky nebo nebezpečné signály PAMPs (molekulární struktury/vzory typické pro povrch buněk patogenních mikroorganismů). PAMPs jsou rozpoznávány PRRs (receptory rozeznávající molekulové vzory) na povrchu APC. Receptory PRR jsou např. *Toll-like* receptory (TLR), C-lektinové receptory či NOD *like* receptory (NLR). Aktivace těchto odlišných detektorů nebezpečí spouští kaskádu signálů

vedoucích k zahájení antiinfekčních humorálních a buněčných imunitních odpovědí a ke kontrole orální tolerance [1].

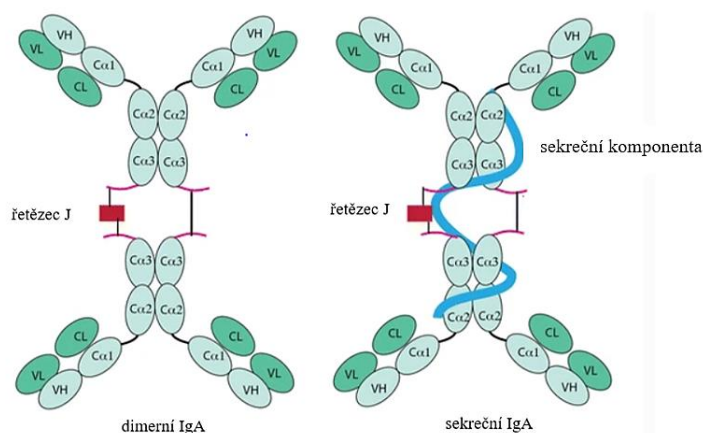
Aktivované B a T lymfocyty migrují do krevního řečiště pomocí eferentní lymfy a selektivně se dispergují do efektorových mukózních tkání, aby se diferencovaly na efektorové buňky (plazmatické buňky vylučující protilátky, cytotoxické buňky, regulační buňky) [37]. Kontingent aktivovaných lymfocytů na induktorových místech se převádí na paměťové buňky, které cirkulují mezi různými indukčními místy. Migrace efektorových buněk do sliznice závisí na chemotaktických (chemokinech) a/nebo zánětlivých faktorech produkovaných slizničním mikroprostředím. Jejich lokalizace na sliznici je řízena mechanismy molekulárního rozpoznávání sliznic omezenými na specifické integriny a adresiny [39].

Anjuère a Czerkinsky [1] došli k názoru, že DC v místech indukovaných na sliznici hrají důležitou roli při selektivní migraci slizničních lymfocytů. V této studii ukázali, že myši DC izolované z mezenterických ganglií a Peyerových plaků zvyšují expresi $\alpha 4\beta 7$ integrinu a chemokinového receptoru CCR9 na povrchu aktivovaných T lymfocytů. V tomto účinku byla zapojena kyselina retinová (metabolit vitamínu A) produkovaná některými populacemi intestinálních DC. Kyselina retinová je důležitým determinantem intestinální imunity. Hraje důležitou roli v buněčném růstu, diferenciaci, organogenezi a reprodukci. Podněcuje dendritické buňky k exprimování CD 103 a k samoprodukcii kyseliny retinové, což indukuje T lymfocytární receptory $\alpha 4\beta 7$ a CCR9 a zvyšuje diferenciaci Foxp3 + indukovatelných Treg lymfocytů zprostředkovaných transformací růstového faktoru (TGF)- β [43]. Také bylo prokázáno, že intestinální DCs exprimující integriny $\alpha E\beta 7$ (CD 103) jsou odpovědné za diferenciaci CD 4 a CD 8 T lymfocytů do efektorových buněk, aby se diferencovaly v slizniční buňky. Všechny tyto poznatky částečně vysvětlují koncepci rozdělení MALT. Při vakcinačním postupu je cesta imunizace zvolena podle místa, kde má být exprimována efektorová odezva [1].

Zatímco orální imunizace může indukovat významnou protilátkovou odpověď v tenkém střevě, ve vzestupném tračníku a v slinných a mléčných žlázách, není tato cesta účinná pro produkci protilátek IgA v distálním segmentu tlustého střeva, v mandlích a v děložní sliznici. Nazální imunizace přednostně indukuje tvorbu protilátek ve sliznici dýchacího ústrojí a v regionálních (nosních a slinných) sekretech. Zajímavým zjištěním pro vývoj vakcín proti pohlavně přenosným chorobám bylo, že může nasální imunizace indukovat odpověď protilátek v cervikovaginální sliznici [1].

1.1.4.3 Ochranná imunitní odpověď

Převládajícím izotypem imunoglobulinů, který je konstitutivně lokalizován v slizničním hlenu a dalších tělních sekretech (jako jsou sliny a slzy), je IgA. Jak v *lamina propria*, tak v exokrinních žlázách produkuje asi 80 % všech přítomných B lymfocytů a plazmatických buněk polymerní IgA (Obrázek 2). Tyto polymerní IgA se diferencují na sekreční IgA, neboť se uvolňují do hlenu a tělních sekretů prostřednictvím poly-Ig receptoru. Sekreční IgA se skládá ze dvou molekul IgA (dimerní IgA), spojovacího proteinu (řetězec J) a sekreční komponenty (SC). Komplex dimerního řetězce IgA-J je produkován B lymfocyty v submukózních tkáních. SC je konstitutivně exprimována bazolaterálně na sekrečních epiteliálních buňkách a působí jako receptor pro dimerní IgA [44]. Poté, co se IgA váže na SC, prochází celý komplex transcytózou a je transportován na apikální povrch buňky, kde je sIgA komplex uvolňován do prostředí sliznice [6].



Obrázek 2: Schematické znázornění dimerního a sekrečního IgA. Variabilní domény těžkých (VH) a lehkých (VL) řetězců a konstantní domény těžkých (C α 1, C α 2, C α 3) a lehkých (CL) řetězců. Převzato a upraveno z: [6].

SC chrání sekreční komplex IgA před proteázami přítomnými v prostředí sliznice. Jsou tedy vysoce rezistentní na širokou škálu hostitelských a mikrobiálních proteáz. Dimerní IgA jsou schopny současně vázat dva antigeny, a tak mohou být vytvořeny velké komplexy antigen-protilátka [6]. Nezávisle na antigenní specifitě sIgA, podporují bariérovou ochranu proti patogenům vazbou na povrchové molekuly exprimované patogeny. Tímto způsobem IgA neutralizují mikroby a usnadňují jejich odstranění mukociliárním odbouráváním, inhibují mikrobiální vazbu na epiteliální buňky, absorpci potenciálních alergenů a zvyšují aktivitu laktoferinu a laktoperoxidázy [44]. sIgA nejsou účinným aktivátorem komplementu, tudíž je menší pravděpodobnost spuštění kaskády a zahájení vzniku zánětu. Denně se vylučuje přibližně 40 – 66 mg sIgA na kg tělesné hmotnosti, zejména z GIT. Celkové množství syntetizovaného IgA je téměř dvojnásobné oproti množství IgG produkovaného denně u lidí.

Zajímavým faktem je, že hlavními efektorovými látkami na slizničních površích nejsou IgA B lymfocytů, ale T lymfocyty (fenotypů CD 41 a CD 81) [6].

Specifická humorální imunita slizničních povrchů je tedy kontrolována sIgA. Produkce specifického IgA namířeného proti slizničním patogenům nebo rozpustným proteinovým antigenům je T-dependentní. Cytokiny, včetně TGF- β a IL-10, produkované různými buňkami slizniční tkáně (epiteliální buňky, ale také fibroblasty a vrozené imunitní buňky), se podílejí na vzniku Th lymfocytů při izotypovém přepínání slizničních B lymfocytů a jejich diferenciaci na plazmatické buňky produkující IgA. To naznačuje význam slizničního mikroprostředí. Slizniční či sérové imunoglobuliny IgM či IgG také přispívají k imunitní obraně urogenitální sliznice a dýchacího traktu [41]. Slizniční cytotoxické T lymfocyty (CTL) jsou hlavními efektorovými buňkami v imunitní obraně proti infekcím některými patogeny (viry a intracelulárními parazity) [42]. Stimulace indukce CTL může být také zprostředkována přírodními bakteriálními toxiny nebo jejich detoxikovanými deriváty. Pro imunitní obranu je také nezbytné generování CD 4+ Th lymfocytů, které mohou aktivovat fagocyty během virové či bakteriální infekce [33].

1.1.4.4 Regulace imunitní odpovědi

MALT disponuje imunologickými tolerančními vlastnostmi pro kontrolu zánětlivých odpovědí proti přebytku nepatogenních antigenů přítomných v životním prostředí [42]. Slizniční tolerance může být indukována různými regulačními mechanismy, včetně delecce nebo anergie aktivovaných lymfocytů nebo indukce Treg lymfocytů [39]. Na regulaci slizniční odpovědi se mohou podílet různé typy regulačních lymfocytů, jako jsou antigen-specifické T lymfocyty [6] či přirozené CD 4+ CD 25+ T lymfocyty, které řídí proliferaci buněčného kontaktu [1].

Intraepiteliální $\gamma\delta$ lymfocyty a intrahepatické lymfocyty se také mohou podílet na regulaci imunitní odpovědi indukované inhalací nebo požitím antigenů. Některé střevní makrofágy mohou řídit zánět související s přítomností patogenů prostřednictvím vrozeného mechanismu protizánětlivé anergie (při zachování baktericidní aktivity) [41]. Aktivace, expanze a přežití různých efektorových lymfocytů (ochranných a/nebo regulujících) je řízena APC. Mezi těmito látkami mají rozhodující vliv DC, které se nacházejí v mukózní tkáni. Stupeň diferenciaci a lokalizace DC v slizniční tkáni, stejně jako povaha antigenu (který je jimi zachycován), má významný účinek na způsob indukované imunitní odpovědi (produktivní reakce či tolerance) [1].

Vrozený imunitní systém přirozeně interaguje s invazivními patogeny prostřednictvím interakce ligand-receptor mezi již zmíněnými PAMP a PRR, které jsou přítomné na povrchu leukocytů – manózoový receptor, galaktózoový receptor, receptor CD14, TLR, *scavenger* receptory, ale také třeba cytosolické NLR. Různé buňky, včetně neutrofilů, makrofágů a DC, exprimují na svých buněčných površích PRR, které rozpoznávají patogen jako extracelulární částicový antigen. Po detekci PAMP na patogenech vyvolávají PRR zánětlivé reakce, které nejen ničí napadající patogeny, ale také aktivují adaptivní imunitní systém [45].

1.2 Slizniční vakcíny

Transport komplexních molekul na sliznici (jako jsou peptidy, proteiny, oligonukleotidy a plazmidy), je jedním z intenzivně studovaných témat v souvislosti s vakcinací. Použití koloidních nosičů vyrobených z hydrofilních polysacharidů (např. z chitosanu) je slibná alternativa pro zlepšení transportu makromolekul přes biologické povrchy [46]. Slizniční vakcinací lze dodat antigenní látky nazální, orální, oční, plicní, sublingvální, rektální a vaginální cestou (Tabulka 1) [47]. Nejčastěji studované cesty podání látek na sliznicích jsou orální a intranasální. Orální a intranasální vakcíny jsou v organismu snadněji distribuovány než injekčně aplikované vakcíny, a navíc umožňují podání široké škály antigenů a mohou tak účinně indukovat systémovou i slizniční imunitu [2].

Tabulka 1: Srovnání slizničních vstupních cest. Převzato a upraveno z: [47].

Cesta	Výhody	Nevýhody	Specifické funkce
Orální	Nejjednodušší, dobrá poddajnost pacienta	Degradace antigenu v GIT	GALT je zodpovědný za imunitní odpověď
Nasální	Rychlejší a silnější imunita	Antigen se může přeměrovat do CNS	Stimulace Th 1, Th 2 a CTL
Rektální	Nutné vyvarování se exponování antigenu nízkému pH a proteolytickým enzymům	Vyloučení vakcíny a neochotná spolupráce pacienta	Účinná indukce specifické imunitní odpovědi v distálních místech slizničního imunitního systému
Plicní	Cílená dodávka vakcíny do alveol	K vakcinaci je nutný aerosolový systém	BALT je zodpovědný za imunitní odpověď
Sublingvální	Nejúčinnější při léčbě alergií I. typu	Místní citlivost, jako je orální svědění	Indukce Treg a aktivace Th1 lymfocytů
Oční	Účinná lokální imunita proti očním patogenům	Špatná oční biologická dostupnost, vliv slz a ředění	CALT je zodpovědný za imunitní odpověď
Vaginální	Účinné navození lokální imunity, nízká enzymatická aktivita a relativně velký povrch	Neochotná spolupráce pacienta	Imunitní odpověď pod hormonální kontrolou

1.2.1 Mechanismy působení slizniční vakcíny

Slizniční vakcína poskytuje ochranu před infekcemi následujícími mechanismy:

- I. Indukuje produkci IgA protilátek, které brání neinvazivnímu patogenu (např. nebakteriálního původu) před navázáním a kolonizací povrchu sliznice [3].
- II. Zabraňuje invazivnímu patogenu proniknout a replikovat se v buňkách sliznice [48].
- III. Zabraňuje vstupu bakteriálního toxinu na povrchu sliznice [48].
- IV. Zabraňuje produkcí IgG v adhezi a pronikání patogenu přes sliznice, který získává přístup prostřednictvím systémového oběhu do různých tkání [47].
- V. Aktivuje imunitní odpověď zprostředkovanou buňkami, která pomáhá při eliminaci intracelulárního patogenu [2].

Mezi výhody slizničních vakcín (oproti parenterální imunizaci) se řadí například snadnost podávání či neinvazivita. I přes tato pozitiva bylo pro lidské užití dosud vyvinuto jen velmi málo slizničních vakcín s použitím celých mikroorganismů [5].

Účinnost perorálních vakcín je stále komplikovaná, neboť dochází k degradaci antigenu v GIT a k nízkému vychytávání Peyerovými plaky, které jsou umístěny v dolním ileu. PP jsou hlavním cílem orálně podávaných vakcín. Začleněním vakcíny do mikročasticových systémů pro cílený transport léčiva, je vakcína chráněna před degradací na své cestě do slizniční tkáně a je účinně zacílena a absorbována M-buňkami [49]. Kromě toho je obtížné endocytovat časticové vakcíny ve střevní sliznici. Aby se zvýšila účinnost absorpce částic epitelovými buňkami, jsou vyžadovány různé přístupy a strategie, včetně modifikace jejich fyzikálně-chemických vlastností (aby se maximalizovala interakce částic s endocytózovými buňkami působícími ve střevech) [41].

U aerosolově přenášených nemocí je žádoucím způsobem aplikace vakcíny intranazálně nebo inhalačně, neboť plicní tkáň poskytuje 75 – 140 m² plochy povrchu pro absorpci vakcíny nebo léčiva. Stěny alveol jsou tenké jako šířka jedné buňka, což vytváří vzdálenost mezi alveolárním lumenem a systémovou cirkulací pouze 400 nm. Tato cesta dodání je konfrontována různými faktory (včetně slizniční bariéry a systému clearance). Důsledkem setrvačnosti větších částic v orofaryngu, konduktivnosti dýchacích cest a gravitační sedimentace, je zabráněno částicím větším než 5 μm k dosažení „hlubokých plic“, zatímco Brownova difúze způsobí, že většina částic menších než 500 nm bude vydechnuta [50].

1.2.2 Současné licencované slizniční vakcíny

Od 21. století se slizniční vakcíny významně dostaly do vědeckého centra pozornosti. Při vývoji slizničních vakcín zpočátku dominovaly orální vakcíny (např. vývoj vakcíny proti poliomyelitidě v roce 1960 či proti adenoviru v roce 1980), avšak mnoho perorálních vakcín, které se v předklinických studiích ukázaly jako účinné, v klinických studiích selhalo. V letech 1998 – 1999 byly živé oslabené vakcíny proti rotaviru a *S. Typhi* úspěšně uvedeny na trh. Následoval vývoj intranazálních vakcín a dnes se zkoumá mnoho různých variant pro dodávání slizničních vakcín, včetně aerosolových inhalací a intravaginálních, rektálních a sublingválních cest. Tyto cesty pro vakcinační aplikace fungují prozatím dobře na experimentálních zvířecích modelech, ale pouze orální a intranazální aplikace byly dosud používány pro licencované lidské vakcíny [51]. Kromě živých oslabených vakcín se používají tři WHO předkvalifikované inaktivované perorální vakcíny proti choleře (Dukoral®, Shanchol™ a Euvichol®), u nichž bylo prokázáno, že poskytují vysoké hladiny (60 – 95%) dlouhodobou (> 2 roky) ochranu [52].

Většina v současné době licencovaných humánních slizničních vakcín zahrnuje atenuované kmeny patogenních mikroorganismů, které si zachovávají svou imunogenitu během průchodu horním GIT a mohou zacílit na induktivní imunitní místa v tenkém a tlustém střevě nebo v horních cestách dýchacích. Budoucí slizniční vakcíny by měly být vyráběny s více purifikovanými složkami antigenu, které budou relativně méně imunogenní [53].

Subjednotkové vakcíny doposud neposkytly lidem dlouhodobou ochrannou slizniční imunitu. Slabá imunogenicita inertních molekul a proteinových subjednotkových antigenů pro slizniční podání, je z velké části způsobena jejich neefektivní absorpcí epitelem sliznice a transportem do MALT. To odráží významné fyzické, biochemické a mikrobiální překážky, které musí orálně a nazálně podávané vakcíny překonat v GIT a respiračním traktu, aby bylo možné získat a aktivovat imunitní buňky sliznice [54].

1.2.3 Optimalizace podání očkovacích látek na sliznici

Preventivní nebo terapeutické slizniční vakcíny by měly být navrženy tak, aby se zaměřily na lokální imunitní systém [1]. Ideální vakcína by měla chránit vakcinační antigeny před enzymatickými nebo chemickými degradacemi a omezit jejich eliminaci nebo nadměrné zředění. Mělo by být docíleno účinného vychytávání a prezentace antigenů M-buňkami (M-buňky nosí lymfoidní tkáň fungují podobně jako buňky nalezené v Peyerových placích ve střevě, více v kapitole 1.3.2) a v neposední řadě by měla vakcína

stimulovat aktivaci vrozeného imunitního systému a vyvolání dlouhodobé imunologické paměti [55].

Expresní forma vakcinačních antigenů má významný vliv na typ a účinnost imunitní odpovědi. Rozpustné antigeny obecně vykazují nižší imunogenitu v mukózních vakcínách. Slibnou strategií, jak překonat tuto překážku, je enkapsulace vakcinačních antigenů do vhodného transportního systému. Biodegradovatelný polymerní nanočásticový systém, obvykle chránící antigeny před trávicími enzymy a přirozenou imunitou, je obecně přijímán jako účinný nosič pro slizniční antigeny [56]. Dodání vakcinačního antigenu přes povrch sliznice aktivuje slizniční B a T lymfocyty a stimuluje IgA odpověď, která pomáhá při vytváření vzdálené slizniční imunitní odpovědi. IgA pomáhají při inhibici kolonizace slizničních povrchů patogeny a zvyšují cytotoxicitu zprostředkovanou buňkami v lumenu [5].

Protože je slizniční membrána různě členěná, specifické místo kontaktu s antigenem vyvolá silnou imunitní odpověď právě v této oblasti, ale nemusí být tak účinná ve vzdálených kompartmentech sliznice. Například imunitní odpověď vyvolaná orálně aplikovanou vakcínou nemusí být tak silná v sliznici dýchacího traktu, ve srovnání s její reakcí vyvolanou v GIT [57].

Patogeny napadající organismus parenterální cestou jsou ovlivňovány IgG přítomnými v systémové cirkulaci. Od té chvíle už IgG nemají žádnou roli v slizniční imunitě, patogeny mohou touto cestou vniknout do těla. Naopak, slizniční aplikace vede k produkci jak sekrečních IgA, tak také k produkci IgG. Většina patogenů prostupuje do lidského těla jednou či více slizničními cestami, je tedy stimulace produkce povrchových protilátek IgA nejlepším způsobem, jak patogen zachytit na vstupní úrovni [47].

1.2.4 Složení slizničních vakcín

Žádná vakcína není účinná, pokud není formovaná vhodným způsobem podporujícím její imunogenitu. Vakcína by měla obsahovat složky, které umožňují účinné vychytávání antigenů přes slizniční membránu. Antigeny dodávané v částicích jsou lépe rozpoznávány vrozeným imunitním systémem, a jsou tedy silnějšími induktory slizniční imunitní odpovědi než rozpustné antigeny. Je pravděpodobné, že vakcíny založené na nanotechnologiích budou nejúčinnějšími transportními prostředky pro neživé subjednotkové slizniční vakcíny, neboť je možné modifikovat jejich velikost, obsah a vlastnosti cílení na buňky imunitního systému. Optimální skladba slizniční vakcíny, včetně vhodné kombinace antigenů a nosičů léčiv, by měla být schopna vyvolat komplexní sérii ochranných imunitních odpovědí.

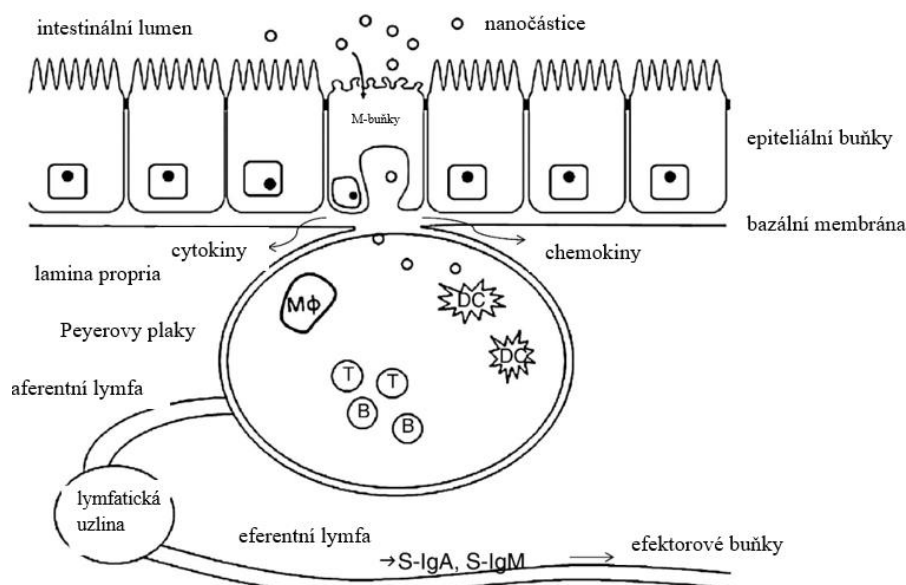
Avšak optimální chemické složení nanočástic pro účinnou stimulaci slizničních imunitních odpovědí je stále předmětem mnoha studií [53].

Pro inaktivované slizniční vakcíny existují různé **rozpustné formulace**. Přístup vakcínových antigenů k tkáním, které aktivují imunitní buňky, je bráněn neustále se obnovující slizovou vrstvou, která pokrývá slizniční tkáň. Aby se zvýšila šance na účinnou absorpci antigenu, byly vyvinuty slizniční vakcíny, které obsahují složky, jako jsou mukoadhezivní chitosan a škrob, které zlepšují adhezi na slizniční membrány. Cílem je vytvořit těsný kontakt mezi rozpustnými vakcinačními antigeny a mukózní membránou. Použití těchto rozpustných formulací je zatím částečně úspěšné, ačkoli volba adjuvans spíše než mukoadheziva, se v mnoha případech jeví jako klíčová pro účinnost vakcíny. Bylo však prokázáno, že chitosan má jak mukoadhezivní, tak adjuvantní vlastnosti, a může tak plnit dvě funkce, které zvyšují účinnost vakcíny. Mukoadhezivní formulace účinně zvyšují intranasální a intravaginální imunizaci, pravděpodobně kvůli dlouhodobé retenci antigenu [58].

Pro zlepšení účinnosti slizničních vakcín mohou být použity transportní systémy zprostředkované **částicemi**. Ideální systém pro dodávání částic pro slizniční vakcinaci by měl být schopen zacílit na nezbytnou slizniční oblast, umožnit interakci s buňkami, které jsou předmětem zájmu, a poskytnout ochranu vakcinačního antigenu během dodání [23].

Vakcíny na bázi částic jsou obecně účinnější než rozpustné antigeny při stimulaci ochranné imunitní reakce. Příkladem jsou např. virové částice, bakteriální částice, biologicky rozložitelné mikročástice, nanočástice a imunostimulační komplexy. Částicové vakcíny mohou navázat těsný kontakt se slizničním epitelem prostřednictvím začlenění „kotvících“ zařízení (jako jsou lektiny a specifické imunoglobuliny), která mají adhezivní vlastnosti nebo prostřednictvím začlenění imunomodulačních molekul (jako jsou TLR ligandy), které se vážou na odlišné receptory [53].

Cílení vakcín na slizniční povrchy může být provedeno vhodnými způsoby aplikace a začleněním složek zaměřujících se na sliznice nebo M-buňky na nosičový systém částic [23]. Cílení částic na slizniční membránu také usnadňuje absorpci antigenu přes epiteliální bariéru (Obrázek 3) prostřednictvím specializovaného epitelu asociovaného s folikuly (FAE), který překrývá MALT. To umožňuje zacílení částic přímo na APC a cílenou modulaci uvolňování chemokinů a cytokinů pro zvýšení aktivace T lymfocytů zvýšenou ko-stimulací [59].



Obrázek 3: Imunitní reakce při expozici nanočásticemi. Převzato a upraveno z: [40].

Částicové vakcíny jsou snadno absorbovány APC, neboť velikost částicových vakcín je srovnatelná s velikostí běžných patogenů. Částice větší než 0,5 μm jsou internalizovány v APC prostřednictvím fagocytózy, zatímco rozpustné antigeny nebo menší částice jsou významně internalizovány endocytózou [60]. Internalizace částicových vakcín prostřednictvím fagocytózy do fagozómů má klíčové důsledky, neboť fagozomy jsou považovány za kompetentní orgány pro „cross“ (křížovou) prezentaci antigenů. Na rozdíl od rozpustných antigenů, které jsou přednostně prezentovány cestou MHC II. třídy, mohou částicové antigeny internalizované ve fagozómech vstoupit jak do komplexu s MHC I. třídy, tak s MHC II. třídy. Tímto je umožněna indukce odpovědi CTL, což je vlastnost, která není dosažitelná endocytózou rozpustných antigenů. Tyto buněčné imunitní reakce hrají důležitou roli při prevenci infekcích způsobených intracelulárními viry a bakteriemi [53].

Konkrétní typ FAE, skládající se z M-buněk a nacházející se nad NALT a Peyerovými plaky, má speciální vlastnosti, které umožňují pohlcení a transcelulární transport antigenů do subepiteliálního povrchu. Na tomto povrchu mohou antigeny stimulovat specifické

CD 4+ T lymfocyty v mezifolikulárních oblastech [61]. Cílení slizničních vakcín na M-buňky bylo úspěšně prozkoumáno s využitím agonistů TLR, specifických lektinů (jako je aglutinin *Ulex europaeus*) a protilátek specifických pro markery povrchových M-buněk (jako je glykoprotein) [62].

Tvar a velikost částic je možné modifikovat, aby se maximalizovaly interakce na buněčné úrovni. Fagocytární buňky jsou schopné přijímat částice o velikosti 1 a 5 μm , a proto zacílení na tyto buňky ve střevním nebo respiračním traktu umožňuje použití větších částic. Naproti tomu epiteliální buňky mohou endocytovat pouze částice, které jsou v rozsahu nano velikosti, což poskytuje větší potenciál pro absorpci částic. Úspěšná fagocytóza částic závisí na jejich tvaru a velikosti. Například sférické a protáhlé částice jsou obecně snáze fagocytovány ve srovnání s diskovitými částicemi se stejným objemu [63]. Regulace velikosti a tvaru částic je tedy nezbytná pro řízení a zlepšení interakcí částic se zamýšlenými cílovými buňkami. Důležitá je také ochrana vakcinačního antigenu během transportu, která může být zprostředkována použitím částicových transportních systémů, které jsou kompatibilní se specifickou cestou podání a typem antigenu. Kromě zvážení typu vakcíny a transportních strategií, slizniční vakcíny často vyžadují pomocné látky (adjuvans) [53].

1.2.5 Intranasální vakcinace

Nazálně podávané vakcíny musí být na rozdíl od perorálního podání transportovány na velmi krátkou vzdálenost a působit v nosní dutině pouze asi 15 minut. Nejsou vystaveny nízkým hodnotám pH a degradujícím enzymům. Proto v případě nazálního podání nemusí být vakcína nutně začleněna do mikročástic, ale může být podávána společně jako roztok chitosanu nebo práškové substance. Výhody nasální vakcinace oproti perorální vakcinaci jsou uvedeny v Tabulce 2 [49].

Tabulka 2: Výhody nasální vakcinace oproti perorální vakcinaci.

Vyšší propustnost slizniční membrány ve srovnání s GI slizniční membránou.	[65]
Ochrana antigenu před vystavením nízkému pH.	[47]
Nízká enzymatická aktivita ve srovnání s GIT.	[66]
NALT se skládá z DC, jež jsou nejúčinnější buňky prezentující antigen.	[65]
Nasální vakcinace vede ke stimulaci antigen specifických Th1 a Th2 lymfocytů.	[3]
Nasální sliznice produkuje rychlejší a silnější imunitní odpověď ve srovnání s orální cestou vakcinace.	[2]
NALT si uchovává dlouhodobou paměť, proto následná expozice antigenu vede k rychlé imunitní reakci.	[34]
Intranazální vakcinace může také stimulovat odpověď zprostředkovanou CTL, která hraje důležitou roli při eliminování intracelulárních patogenů a virů.	[34]

Nosní sliznice představuje vhodný alternativní způsob očkování. Nosní lymfoidní tkáň je zodpovědná za stimulaci imunitní odpovědi. NALT je anatomicky podobný GALT, ale má rozvinutější lymfoidní folikuly než GALT, a také se skládá z četných M-buněk, DC a několika pohárkových buněk. M-buňky NALT fungují podobně jako buňky nalezené v Peyerových placích ve střevě [47]. Na nosní sliznici je možné aplikovat buď samotné mikroorganismy formou téměř všech již zmíněných vakcín nebo také ve směsi s urychlovači penetrace, případně ve formě mikročástic obalených membránou, imunostimulačních komplexů či liposomů [64].

Při nazální vakcinaci vytváří antigen buď imunitní odpověď nebo rozvíjí toleranci [67]. Partidos et al ve studii uvedl, že se toto rozhodnutí řídí fyzikální povahou antigenu a jeho interakcí s NALT [68]. Ačkoli je tolerance v případě očkování nežádoucí, může to být velmi účinný nástroj proti autoimunním onemocněním [69]. Zjistilo se, že částicové antigeny vykazují slizniční imunitní odpověď, zatímco rozpustné antigeny navozují systémovou imunitní odpověď. Tento rozdíl je způsoben usnadněnou difúzí rozpustného antigenu přes nosní epitel, který je prezentován povrchovým cervikálním lymfatickým uzlinám a stimuluje produkci IgG. Zatímco M-buňky v NALT selektivně přijímají částicový antigen a stimulují tvorbu IgA protilátek [49].

Na celém světě jsou licencovány nejméně tři nosní vakcíny [64]. Vakcína ve spreji určená pro nasální užití proti chřipce zvaná FluMist, složená z živého atenuovaného a na chlad adaptovaného viru chřipky, byla první pokročilou intranazální vakcínou použitou v roce 2003 ve Spojených státech [70]. Druhou vakcínou je Fluenz, což je kvadrivalentní vakcína proti chřipce. Třetí vakcíně nazývané NasoVac (proti pandemii chřipky A/Kalifornie/7/2009 H1N1) udělil licenci Indický sérový institut [64].

1.3 Adjuvans

Adjuvans jsou pomocné látky používané pro zlepšení efektivity vakcinace. Slizniční vakcíny se samotným antigenem často nevyvolávají silnou imunitní odpověď dostatečnou k zajištění dlouhodobé ochrany před infekcí [72]. Pomocné látky zlepšují imunogenicitu méně imunogenních vakcínových proteinů nebo peptidů [35]. Hrají důležitou roli v moderních vakcínách tak, že působí jako „spojka“ mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Adjuvans jsou molekuly nebo makromolekulární struktury, které v místě podání zajišťují aktivaci eozinofilů a produkci IgE rozvojem lokálního zánětu [72]. Adjuvans zlepšují vakcinační

účinky, a to zvýšením produkce cytokinů, indukci protilátek, přepínáním tříd a cílením na lumenální povrch s následnou absorpcí M-buňkami. Přídavek adjuvans k vakcínám zvyšuje imunogenitu antigenního proteinu, čímž snižuje požadované dávky antigenu [73]. Při vývoji vakcín je volba adjuvans často stejně důležitá, jako výběr vhodného antigenu [74]. Výběrem vhodného adjuvans lze ovlivnit kvalitu imunitní odpovědi – zejména vývoj klonů B lymfocytů s vysokou afinitou, paměťových B-buněk a plazmatických buněk [75]. Adjuvans slouží zároveň jako sorbenty, přičemž vzniklá gelová struktura může pozitivně ovlivnit i délku imunitní odpovědi [10].

1.3.1 Typy adjuvans

Slizniční adjuvans lze rozdělit na **imunostimulátory** a **transportní systémy** nebo kombinace obou, a to **imunostimulační komplexy** (ISCOMS). Slizniční adjuvantní aktivita ISCOMS souvisí se složkou těchto systémů, odvozenou od saponinů. Mezi imunostimulační adjuvans se řadí tepelně labilní enterotoxin *E. coli* (LT), enterotoxin bakterie *Vibrio cholerae* (CT), Toll-like receptorové (TLR) ligandy či cytokiny. Imunostimulační adjuvans jsou schopna aktivovat vrozenou imunitu přímo, zatímco transportní systémy (např. virům podobné částice, lipozomy a archeozomy), chrání antigeny před nepříznivými podmínkami a cílenými M-buňkami na mukózních površích. Aplikační transportní systémy zprostředkované částicemi mohou být zacíleny na M-buňky povrchovými modifikacemi – mukoadhezivy a lektiny, které se přirozeně vážou na povrchy M-buněk [72]. M-buňky jsou ideálním cílem slizničních vakcinačních strategií. Nejen, že jsou lokalizovány na FAE slizničních imunitních indukčních místech, ale mnoho APC se vyskytuje poblíž M-buněk. Membránové epitelové buňky specificky exprimují protein GP, který do těchto buněk řídí transcytózu bakteriálního adhesinu FimH+. Proto mohou být použity markery specifické pro M-buňky pro dodávání antigenu do slizničních imunitních indukčních míst [76].

Další typ receptorem zprostředkovaného slizničního adjuvans zahrnuje molekuly, které se vážou na receptory rozpoznávající vzory (např. TLR a mannosové receptory), které se nacházejí na makrofázích a DC [72]. Příkladem PAMP vázajícího se na tyto receptory jsou lipopolysacharidy z Gram negativních bakterií. Tyto molekuly se sdružují s TLR4 buňkami prezentujícími antigen, což vede k uvolnění různých prozánětlivých cytokinů, které mohou ovlivnit adaptivní imunitní odpověď a k aktivaci B lymfocytů [76].

Schopnost adjuvans plnit svůj cíl závisí na její struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech ve vztahu k buněčným receptorům a typům antigenu. Mezi genové slizniční

pomocné látky patří mimo jiné proteinové toxiny, rekombinantní proteinové podjednotky a nukleové kyseliny, z nichž každá má potenciál zvýšit účinnost slizničních vakcín [72].

Adjuvans mohou být **živé vektory** (např. *Salmonella* a *Adenovirus*), které se pomocí genových rekombinačních technik modifikují tak, aby exprimovaly relevantní proteiny [3]. Adjuvans živého vektoru může fungovat jako systém pro dodávání antigenu i jako imunomodulancium. Živé vektory bývají často nestabilní a málo vakcín založených na této technologii dosáhlo klinické praxe. **Neživé pomocné látky** mohou být složeny z lipidů nebo gelu, pro vytvoření depotního účinku po aplikování vakcíny. Řadí se sem také liposomy a polylaktidové/polyglykolidové mikrosféry; nebo modulátory (jako je muramyl dipeptid a monofosforyl lipid A) [34].

Ideální slizniční adjuvans by mělo podporovat absorpci antigenu různými slizničními cestami; chránit před enzymatickým štěpením; posílit imunologickou paměť; být nekarcinogenní a nepyrogeenní; být stabilní v širokém rozmezí pH a stimulovat silné humorální a buněčné imunitní reakce [3]. Nejslibnější mukózní adjuvans jsou odvozena od bakteriálních toxinů, cytokinů či TLR. Hliníková sůl je jednou z nejpoužívanějších parenterálních pomocných látek, přesto je však slabým induktorem slizniční imunitní odpovědi, neboť vyvolává tvorbu IgE protilátek. Dalšími používanými adjuvans jsou cytokiny (IL-1, IL-2, IL-12), chitosan, QS21: purifikovaná frakce Quil A, MF59: olej (skvalen) jako emulze ve vodě, MPL: netoxický derivát LPS či muramyl dipeptid [5, 10].

1.3.1.1 Cholerový toxin a tepelně labilní enterotoxin

Nejvíce studované a neúčinnější slizniční pomocné látky, v experimentálních systémech, jsou **toxin cholery (CT)** a **tepelně labilní enterotoxin (LT)** *E. coli* [46]. Jejich toxicita však omezuje jejich použití pro vakcinaci lidí [94]. CT nebo LT *E. coli* jsou nejsilnější slizniční dosud známá adjuvans. Tyto toxiny jsou si velmi podobné a enzymaticky ribosylují Gs protein adenylylcyklázy usnadňující tvorbu cAMP. Slizniční imunitní odpověď u holotoxinových (sestaveny z několika podjednotek) adjuvans je pravděpodobně závislá na DC [72]. Studie však naznačují, že neaktivují vrozený imunitní systém prostřednictvím TLR nebo NLR [77]. V posledních letech bylo vynaloženo velké úsilí na generování toxikologicky přijatelných derivátů těchto toxinů se zachovanou adjuvantní aktivitou pro lidské použití [46]. Nasální podávání derivátů LT a CT může být nepředvídatelné, vzhledem k jejich potenciálním vazebným vlastnostem k neuronům. Zatímco použití orální cestou bylo prokázáno jako bezpečné [78]. CT a LT mohou ovlivnit několik kroků při indukci

slizniční imunitní odpovědi. Tyto účinky (samotně nebo v kombinaci) zahrnují zvýšenou propustnost intestinálního epitelu vedoucího k zvýšenému vychytávání současně podávaného antigenu; zvýšenou prezentaci antigenu různými APC; podporou izotypové diferenciaci v B lymfocyty vedoucí ke zvýšení tvorby IgA. V neposlední řadě tyto účinky zahrnují komplexy stimulačních i inhibičních účinků na proliferaci T lymfocytů a produkci cytokinů [33].

Novou generaci pomocných látek by moly představovat PAMP. Mezi těmito PAMPs je TLR-9 specifická nemetylovaná bakteriální DNA (CpG), která stimuluje vrozenou imunitu a specifickou imunitu po nasální, orální a genitální imunizaci. Adjuvantní aktivita molekul podobných CpG může být značně zvýšena jejich vazbou na CTB [33].

1.3.1.2 Cytokiny a chemokiny

Cytokiny a chemokiny jsou malé proteiny uvolňované různými typy buněk a jsou také zkoumány v souvislosti s aktivací slizničního imunitního systému za účelem zvýšení lokální aktivity CTL a/nebo ke zvýšení titrů IgG a IgA. Cytokiny IL-1, IL-2, INF- γ a granulocytární a makrofágy stimulující faktor (GM-CSF) byly použity jako adjuvans s ohlášeným úspěchem v různých preklinických studiích vakcín. Zejména cytokiny IL-1, IL-1a, IL-1B, IL-18 a IL-33 použité jako adjuvans v rekombinantní vakcíně proti hemagglutininu viru chřipky byly schopny významně stimulovat produkci nazálních IgA a anti-rHA IgG po intranazální vakcinaci u myši [79].

1.3.1.3 Aktivátory žírných buněk

Předpokládá se, že aktivátory žírných buněk pomáhají při aktivaci a uvolňování zánětlivých mediátorů a migraci imunitních buněk do drenážních lymfatických uzlin, čímž aktivují DC, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi [80]. Sloučenina 48/80 (C48/80) je aktivující polymer žírných buněk. Sloučenina 48/80 je směsný polymer p-methoxy-N-methylfenylethylaminu zesíťovaný formaldehydem a široce používaný pro stimulaci žírných buněk nezávislou na IgE. Je to účinné potenciální slizniční adjuvans. Subkutánní nebo nazální podání u zvířat s vakcinačními antigeny a aktivátory žírných buněk jako adjuvans, indukují vysoké množství antigen-specifického IgG v séru [81].

1.3.1.4 Soli hliníku

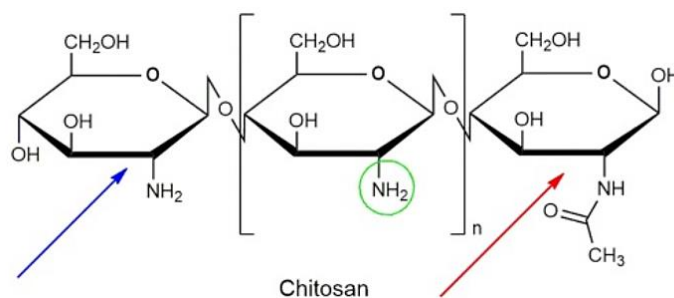
Klinicky schválené adjuvans sestávající ze sraženin fosforečnanu hlinitého a hydroxidu hlinitého, obsahuje na povrchu adsorbované antigeny [10]. Ačkoliv se tradičně předpokládá, že primárně působí vytvořením dlouhodobého depotu pro antigen a podporou jejich vychytávání APC, je nyní zřejmé, že vrozená imunitní stimulace hraje primární úlohu v adjuvantní aktivitě hlinitých solí. Toto adjuvans se používá primárně pro zvýšení produkce protilátek. Hlinité soli nevyužívají TLR pro svou funkci *in vivo* [7]. Soli hliníku však nedokážou poskytnout adekvátní zvýšení protilátkové odezvy na malé peptidy, jakož i některé vakcíny (proti tyfu a chřipce). Obecně je známo, že hliník je špatným adjuvantním prostředkem pro indukci cytotoxické T buněčné imunity a Th1, které jsou potřebné k boji proti několika život ohrožujícím infekcím [82].

1.3.1.5 Freundovo adjuvans

Kompletní Freundovo adjuvans (CFA) je směs parafinového oleje a povrchově aktivního činidla s tepelně usmrcenými *Mycobacterium tuberculosis* nebo *M. butryicum*, ve kterých jsou emulgovány vodné roztoky antigenů. Ačkoliv je CFA nepřijatelné pro humánní použití, studie týkající se způsobu účinku tohoto silného adjuvans mohou poskytnout užitečné informace pro návrh vakcíny. Imunizace proteinovými antigeny v CFA vede k silným Th1 a Th17 buněčným reakcím, které jsou závislé na mykobakteriální složce [10].

1.3.1.6 Chitosan

Chitosan je jednou z nejvyhledávanějších komponent pro syntézu nanočástic pro cílený transport léčiv. Chitosan (Obrázek 4) má silný adjuvantní účinek srovnatelný s Freundovým adjuvans, což bylo prokázáno u zinek-chitosanových částic a emulze obsahující chitosan [4].



Obrázek 4: Chemická struktura chitosanu. Modrá šipka označuje jednotku D-glukosaminu. Červená šipka označuje N-acetyl-D-glukosaminovou jednotku a zelený kruh označuje funkční aminoskupinu. Převzato a upraveno z: [83].

Pozitivní aminová skupina chitosanu může elektrostatickou interakcí vázat stabilní nanočástice s aniontovým materiálem, jako je gen, lék, protein či malá molekula [84].

Jako adjuvantní systém chitosan stimuluje silnou humorální i buněčnou imunitní odpověď. Jako transportní systém působí jako (i) inhibitor mukociliární clearance volné vakcíny a poté účinné absorpce buněk, (ii) inhibitor enzymatické (proteázy/nukleázy) degradace vakcinačních antigenů, (iii) prodlužuje expozici vakcíny a (iv) cíleně transportuje vakcíny k APC [85]. Kromě toho, v závislosti na typu a fyzikálně-chemických vlastnostech částic, mohou nanočástice stimulovat imunitní odpověď spuštěním silné adaptivní zánětlivé odpovědi cestou NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) a sekrecí prozánětlivých cytokinů, IL-1 β a IL-18. Studie ukázaly, že pozitivně nabitě částice, jako je chitosan nebo polymerní chitosanové částice, mohou aktivovat zánětlivé buňky, sekreci prozánětlivých cytokinů a následnou aktivaci Th1, Th2 a Th17 [86]. Vlastnosti, struktura a využití chitosanu a chitosanových nanočástic jsou uvedeny v kapitole 1.4.2.1.

V případě perorálního podání vakcíny na bázi chitosanu Jain a kol. [87] uvádí, že způsob uvolňování antigenu není kontinuální, a je také méně spolehlivý (kvůli vysoké rozpustnosti CS v kyselém prostředí). K překonání tohoto problému zapouzdřili CS-NP do lipidového vezikulárního systému (např. liposomy či niosomy). U albinotických krys uváděli detekci vysokých titrů IgA a IgG s použitím CS-NP s bovinním sérovým albuminem (BSA) enkapsulovaných v liposomech a niosomech. V roce 2006, Borges et al. [88] zveřejnili studii, ve které použili alginátem potažené CS-NP s ovalbuminem jako vakcínu aplikovanou u krys. Zjistili zvýšenou produkci a vysoké titry protilátek IgA.

1.4 Nanočásticové transportní systémy pro transmukózní podání látek

Použití nanočástic pro terapeutické a diagnostické účely, stejně jako pokrok v transportování léků je důležité a velmi potřebné. Tradiční léčiva, která jsou k dispozici pro orální nebo injekční podání, nejsou vždy vyráběna s optimálním složením. Produkty obsahující bílkoviny nebo nukleové kyseliny vyžadují inovativnější typ transportního systému, který zvyšuje jejich účinnost a chrání je před nežádoucí degradací [89]. Je zřejmé, že účinnost většiny transportních systémů pro léčiva je přímo spojena s velikostí částic. Vzhledem k malé velikosti částic a velké ploše povrchu vykazují zvýšenou rozpustnost, a tím i zvýšenou biologickou dostupnost, dodatečnou schopnost překonat hematoencefalickou bariéru, vstup do plicního systému a vstřebávání přes těsné spojení endoteliálních buněk kůže [37]. Nanočásticím vyrobeným z přírodních a syntetických polymerů (biologicky odbouratelné a biologicky neodbouratelné) bude věnována větší pozornost, neboť mohou být modifikovány pro cílený transport léků. Zlepšují biologickou dostupnost a zajišťují řízené uvolňování léků

z jedné dávky [90]. Nanostruktury mají obecně schopnost chránit léčiva, která jsou v nich zapouzdřená proti hydrolytické a enzymatické degradaci. Zprostředkovávají dodávku široké škály léků do různých oblastí těla a mohou za jejich trvalé uvolňování. Jsou schopny dodávat léky, proteiny i geny nejen cestou perorální aplikace [91].

Nanočástice transportují léky, které jsou vysoce nerozpustné ve vodě; mohou tak „obejít“ játra, čímž se zabrání prvotnímu metabolismu začleněného léčiva. Zvyšují perorální biologickou dostupnost léků na základě jejich specializovaných mechanismů absorpce, jako je absorpční endocytóza [89]. Jsou schopny zůstat v krevním oběhu po delší dobu, a tak uvolňovat inkorporované léčivo trvalým a kontinuálním způsobem, což vede k méně plazmatickým výkyvům a tím minimalizují vedlejší účinky způsobené léčivem. Vzhledem k velikosti nanostruktur jsou schopny penetrovat do tkání a jsou včleněny do buněk, což umožňuje efektivní transport léků na místa působení [92].

1.4.1 Nanočásticové vakcíny

Nanočásticové vakcíny obsahují vakcinační antigen, který je buď zapouzdřen uvnitř částic nebo fixován na jejich povrch. Zapouzdření antigenního materiálu do NP poskytuje variantu podávání antigenů, které mohou být v organismu rychle degradovány nebo indukovat krátkodobou lokalizovanou imunitní odpověď [37]. Konjugace antigenů do NP umožňuje prezentaci imunogenů imunitnímu systému téměř stejným způsobem jako u přirozené interakce s cizorodým agens, a tak vyvolat analogickou imunitní odpověď. Kromě toho NP syntetizované z některých kompozitů umožňují nejen cílený transport antigenů, ale také prodloužené uvolňování antigenů pro maximalizaci expozice imunitnímu systému. Studie se zaměřují na potenciál využití NP vakcín netradičními metodami, jako je inhalační podání (např. formou aerosolu) či kombinování několika antigenů inkorporovaných do jedné částice, aby poskytovala ochranu před více než jedním onemocněním [93]. Porozumění mechanismů interakce nanočástic s imunitním systémem je stejně důležité jako analýza potenciálních toxických účinků. NP musí odolávat nejen fyziologickému pH, ale také interakcím vyvolaným ve vysoce komplexním médiu (např. krev) bohatém na proteiny a soli [37].

1.4.2 Způsoby cíleného transportu nanočástic s léky

Nanočástice mohou být do lidského těla podávány třemi hlavními způsoby, a to **přímo – injekčně; inhalací či perorálním podáním**. Nanočástice vstupující do systémové cirkulace nejprve interagují s bílkovinami, což je první fenomén, který zaujímá místo před distribucí do různých orgánů. Absorpce z krevních kapilár umožňuje lymfatickému systému dále distribuovat či eliminovat částice [92]. Vzhledem k tomu, že systém obnovuje přebytečnou tekutinu, získává z tkání také cizí buňky a chemické látky. Jakmile jsou tekutiny filtrovány zpět do krevního oběhu, lymfatické uzliny detekují jakoukoliv procházející cizí agens. Pokud je látka identifikována jako tělu cizí, makrofágy ji fagocytují a vyloučí z těla. Toto se stává problémem pro cílený transport léčiv nanočásticemi; nicméně clearance může být ovlivněna velikostí a charakterem povrchu částic [91].

Existují tři hlavní způsoby dopravy částic obohacených o léky do cílových míst, a to **pasivně, aktivně či fyzicky cílený transport**. Pasivně cílený transport funguje díky zvýšenému účinku permeability a retence, což činí buňky přednostně absorbující tělesa o velikosti nanočástic. Při neaktivně cíleném transportu jsou NP funkcionalizovány pomocí ligandů, které interagují s receptory nadměrně exprimovanými v cílové oblasti. Při fyzicky cíleném transportu se využívají externí zdroje pro vedení NP do cílového místa a pro řízení procesu uvolňování (např. při fototermální či magnetické hypertermické terapii). U všech typů cíleného transportu může být uvolňování léku spuštěno změnou pH či teploty nebo kombinací obou těchto faktorů [94]. Stabilita nanočástic je jedním z nejdůležitějších problémů pro jejich aplikaci v biologických systémech. Jejich obecnou tendencí je totiž agregace jak při skladování jako suspenze, tak také po vystavení biologickým médiím [95].

1.4.3 Vstup nanočástic do krevního řečiště

Při vstupu nanočástic do krve dochází k okamžitému setkání s prostředím **plazmatických proteinů** (opsoninů) a **imunitních buněk**. Interakce nanočástic s opsoniny a krevními složkami (prostřednictvím hemolýzy, trombogenicity a aktivace komplementu) může ovlivnit vychytávání a odbourávání, a tedy potenciálně ovlivnit distribuci a doručení do cílových míst [90]. K absorpci částic imunitními buňkami může docházet jak v krevním oběhu (monocyty, krevními destičkami, leukocyty a DC), tak ve tkáních rezidentními fagocyty (Kupfferovy buňky v játrech, DC v lymfatických uzlinách, makrofágy a B lymfocyty v slezině) [37]. Kontakt nanočástic s imunitními buňkami je ovlivněn mnoha faktory. Ukázalo se, že různé nanočástice působí na různé dráhy imunitních reakcí, stejně tak jako různé vlastnosti částic

ovlivňují, která cesta se aktivuje pro internalizaci částic [90]. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic (velikost, povrchový náboj, rozpustnost a funkční skupiny na povrchu) ovlivňují absorpci a odbourávání částic makrofágy. Vychytávání fagocyty je také závislé na lokálním zakřivení povrchu částic v místě navázání makrofágu. Částice s menším zakřivením povrchu se obtížněji fagocytují než částice s větším zakřivením povrchu [96]. Částice nesoucí kationtové nebo aniontové povrchové náboje jsou pro fagocyty atraktivnější než neutrální částice stejné velikosti [90].

Adsorpce plazmatických proteinů na povrch NP (opsonizace) může nastat prakticky okamžitě po vstupu částic do krevního řečiště [37]. Některé opsoniny mají vysokou vazebnou afinitu, a tedy dlouhou dobu setrvání na určitých površích částic [90]. Opsonizace může způsobit, že budou částice eliminovány, a tak se výrazně sníží počet částic dostupných pro dosažení cílového místa, za současného snížení účinnosti léčiva. Při kontaktu s biologickými tekutinami tedy dochází k adsorpci proteinů na povrchu NP, což vede k tvorbě proteinové korony, která se stává jejich primárním povrchem pro interakci. To může představovat neznámé změny fyzikálně-chemických vlastností NP. Transportní systém nemusí být vždy ovlivněn, ale mohou nastat jiné negativní důsledky, zejména agregace částic, ztráta schopnosti aktivního cílení nebo rozpoznání mononukleárním fagocytárním systémem vedoucím k urychlenému odbourávání. Vzhledem k situaci, kdy je u NP požadováno, aby si udržely svoji integritu a schopnost cílení v průběhu transportního procesu, je důležité předvídat odpověď organismu na nanočástice po jejich podání [97]. Fyzikální vlastnosti výsledného komplexu nanočástice-protein se mohou výrazně lišit od vlastností nativní nanočástice. Vazba proteinu může zvýšit účinnou velikost nanočástice a změnit její povrchový náboj, který pak ovlivní absorpci makrofágů. Mechanismus, kterým dochází k adsorpci proteinů, není zcela objasněn [98].

1.4.4 Vliv slizničního prostředí na vlastnosti částic

Vakcíny podávané slizniční cestou čelí fyzikálním, chemickým a mikrobiálním omezením, což zvyšuje riziko degradace antigenu. Zachytávání vakcíny v částicích může chránit antigeny před degradací nebo denaturací, zvýšit jejich trvalé uvolňování a umožnit společné dodávání antigenů a adjuvans. Kromě toho nepatogenní vehikula vyvolávají méně výraznou anti-vektorovou imunitu, která umožňuje opakovanou imunizaci [99].

Některé z problémů většiny systémů pro transport léků zahrnují špatnou biologickou dostupnost, stabilitu *in vivo*, rozpustnost, intestinální absorpci, trvalý a cílený transport na místo

působení, terapeutickou účinnost, vedlejší účinky a fluktuace léků v plazmě (buď klesnou pod minimální účinné koncentrace nebo překračují bezpečné terapeutické koncentrace). Nicméně, nanotechnologie používané pro dopravu léčiv jsou postupem navrženým k překonání těchto výzev v důsledku vývoje a výroby nanostruktur v submikronovém měřítku a v nanoměřítku, které jsou převážně polymerní a mají mnoho výhod [92].

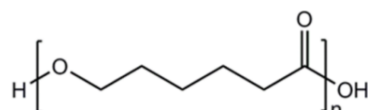
1.5 Polymerní nanočásticové transportéry

Polymerní nanočástice již prokázaly požadované vlastnosti jako nosiče dodávající vakcinační antigeny, proteiny a léčiva na požadovaná místa působení [91, 100]. Vyrábějí se z přírodních a syntetických polymerů. Získaly velkou pozornost díky své stabilitě a snadné modifikaci povrchu. Polymerní nanočástice s nízkou cytotoxicitou mohou chránit dodané antigeny nebo léčiva před degradací za nepříznivých podmínek. Absorpce nanočástic APC může zvýšit a vyvolat účinnou imunitní odpověď. V případě polymerních nanočástic jako transportního systému je stále nedostatek korelací mezi chováním NP *in vitro* a *in vivo*, což ohrožuje aplikace v klinické praxi [42].

1.4.1 Syntetické polymery

K přípravě nanočástic se používají různé syntetické polymery, jako je poly-glykolová kyselina (PGA) a polystyren (velikost částic v rozpětí 200 – 500 nm). Tyto polymerní nanočástice zachycují antigeny, dodávají je do specifických buněk nebo udržují jejich uvolňování prostřednictvím pomalé rychlosti biodegradace [76]. Kopolymer kyseliny glykolové a D,L-mléčné označovaný zkratkou PLGA, se připravuje kopolymerací kyseliny poly-mléčné a kyseliny poly-glykolové. Kopolymerací se minimalizují nevýhody jednotlivých polymerů kyseliny poly-mléčné a PGA. Tyto polymery jsou biologicky rozložitelné a mají schopnost trvalého uvolňování léčiva. PLGA má mnoho významných vlastností, jako je biokompatibilita, mechanická pevnost a snadná manipulace v požadovaných velikostech a tvarech [101]. Špatná stabilita v biologické tekutině má za následek nestabilitu také v zapouzdřených vakcínách. Toto omezení lze překonat modifikací nebo smícháním těchto hydrofobních částic s hydrofilními skupinami nebo polymery, jako je PEG (polyethylenglykol), poloxamery a polyvinylalkohol [102]. Zapouzdření antigenu do struktury polymeru vede ke změně integrity a imunogenity antigenu v důsledku expozice organického rozpouštědla a prostředí s nízkým pH způsobujícím degradaci polymerů. To lze eliminovat adsorpcí antigenu na povrch polymerní struktury spíše než metodou zapouzdření. Výsledkem stabilizace byl systém polymerních lamelárních substrátových částic [100].

Poly-ε-kaprolakton (PCL) je syntetický semikrystalický biologicky rozložitelný a vysoce hydrofobní polymer. PCL vykazuje dobrou stabilitu *in vitro* a výjimečnou schopnost vytvářet kompatibilní směsi s jinými polymery [103]. Tento polymer (Obrázek 5) se ve fyziologickém prostředí (např. v lidském těle) pomalu rozkládá (degraduje hydrolýzou esterových vazeb) a nezpůsobuje hromadění toxických metabolitů. V průběhu let vzrostl zájem o celou řadu různých aplikací včetně tkáňového inženýrství, regenerativní medicíny či dlouhodobého řízeného transportu a uvolňování léčiv [104], neboť trvá více než rok než se polykaprolakton znatelně degraduje, a celková doba rozkladu je až 4 roky.



Obrázek 5: Schéma struktury polykaprolaktonu [104].

Degradace je závislá na molekulové hmotnosti a krystalové struktuře polymeru nebo kompozitu [105]. Pomalá degradace tohoto syntetického polymeru vykazuje benefity v souvislosti s regenerací nervových buněk (neboť nervy se regenerují pomalu). Do PCL lze přidat přírodní biomateriály, aby se zlepšily mechanické vlastnosti a stabilita a současně se zabránilo nutnosti zesítovat a zavést biologicky nevhodné zesítující látky [106].

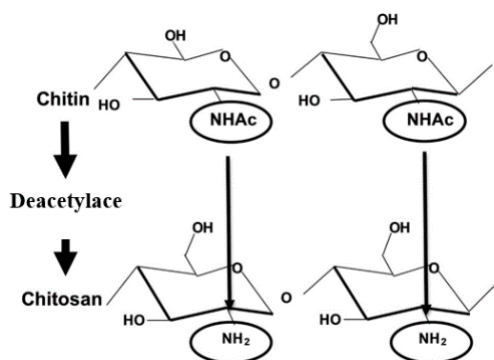
Například zahrnutím hydrofilního polymeru chitosanu do PCL částic se docílí zvýšení imunomodulačních a mukoadhezivních vlastností částic. Toto je zvláště důležité pro transportní systémy antigenu na sliznici. Chitosan poskytne PCL částicím určitý stupeň hydrofilnosti, což zvýší jejich stabilitu ve vodném prostředí [105]. Přítomnost chitosanu vede ke snížení cytotoxicity PCL částic a změně jejich zeta potenciálu částic na pozitivní, čímž selepší jejich schopnost sorbovat na negativní povrch sliznice [107].

1.4.2 Přírodní polymery

Přírodní polymery na bázi polysacharidů, jako je pullulan, alginát, inulin a chitosan, se velmi často používají k přípravě pomocných látek pro nanočástice. Mezi přírodními polymery mají polysacharidy v *in vivo* podmínkách tendenci internalizace a rychlé degradace, což umožňuje pomalé intracelulární uvolňování léčiva. Ve srovnání se syntetickými polymery poskytují přírodní polymery kromě jednoduché kontroly velikosti a povrchových vlastností připravených nanočástic také žádoucí vlastnosti, jako je biokompatibilita a velmi dobrá užitelnost [42].

1.4.2.1 Aplikace derivátů chitosanu

Chitosan (CS) je jedinečný biopolymer, velmi hojný kation s nízkou toxicitou, bez zápachu, s dlouhým řetězcem, s dobrými imunostimulačními a mukoadhezivními vlastnostmi [4]. Tento netoxický biopolymer vzniklý deacetylací chitinu (Obrázek 6) sestává z 1 – 4 spojených zbytků 2-amino-2-deoxy-glukopyranózy (GlcN) a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranózy (GlcNAc) [108].



Obrázek 6: Schematické znázornění přípravy chitosanu z chitinu deacetylací. Převzato a upraveno z: [109].

CS syntetizovaný z přirozeně se vyskytujícího zdroje je biologicky kompatibilní a snadno biologicky odbouratelný [110]. CS nemá dráždivé nebo alergické účinky a je biokompatibilní jak se zdravou, tak s infikovanou lidskou tkání [91].

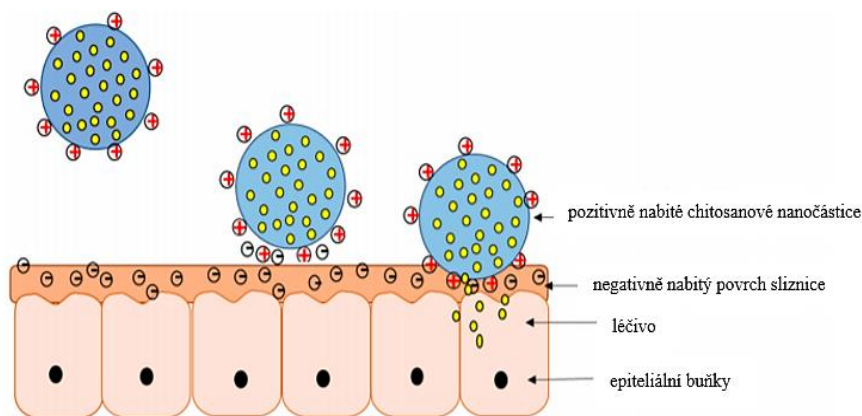
Stupeň deacetylace a molekulová hmotnost chitosanu mají největší vliv na jeho fyzikální a chemické vlastnosti, včetně emulgační kapacity, agregační aktivity, reologických, roztokových a fyzikálně-chemických vlastností [111].

V kyselém prostředí je chitosan ($-NH_2^-$ skupina) protonován jako polykationtový $-NH_3^+$, který může reagovat elektrostatickými vazbami s negativně nabitými chemickými látkami (jako je citrát, sukcinát a tripolyfosfát), za vzniku sítě či se vázat s negativně nabitými plazmatickými proteiny, což vede k adhezi a aktivaci trombocytů, následované tvorbou trombů a srážením krve (koagulací). Tato postupná reakce je částečně zodpovědná za úspěšné použití chitosanu při zrychlení procesu hojení ran [111].

Protože je chitosan slabý polyelektrolyt s pKa kolem 6,5, může tak iontová síla i pH roztoku ovlivňovat vlastnosti chitosanových částic. Při pH nad 6 se aminoskupiny chitosanu deprotonují; polymer ztrácí svůj náboj a rozpustnost. Naopak, při nižším pH se aminoskupiny protonují a stanou se pozitivně nabitými, čímž se chitosan stává kationtovým polyelektrolytem rozpustným ve vodě [112]. K tomuto přechodu mezi rozpustností a nerozpustností dochází při hodnotě pKa mezi pH 6 a 6,5. Chitosan je tedy snadno rozpustný v mírně kyselém prostředí (např. v octové či chlorovodíkové kyselině), a naopak je nerozpustný při neutrálním

a alkalickém pH. Nejen na pH závisí rozpustnost chitosanu, ale také na jeho deacetylaci, M_w a iontové síle roztoku. Za fyziologických podmínek může být chitosan snadno degradován buď lysozymem nebo chitinázami, které mohou být produkovány normální flórou v lidském střevě nebo se mohou nacházet přímo v krvi. Semikrystalická povaha chitosanu poskytuje inter a intramolekulární vodíkové vazby. Stupeň krystalinity je přímo úměrný stupni deacetylace. Chemická modifikace chitosanu zvyšuje antimikrobiální vlastnosti [113].

Chitosanové nanočástice s navázaným insulinem mohou zvýšit intestinální hodnotu absorpce inzulínu a zvýšení jeho relativní farmakologické účinnosti v biologické dostupnosti. Chitosanové nanočástice jsou také používány jako nosiče genů pro zlepšení účinnosti přenosu genů (genotransferu) v buňkách [84]. CS-NP jsou velmi vhodné nanonosiče pro transmukózní vakcinaci díky jejich mukoadhezivním vlastnostem (Obrázek 7).



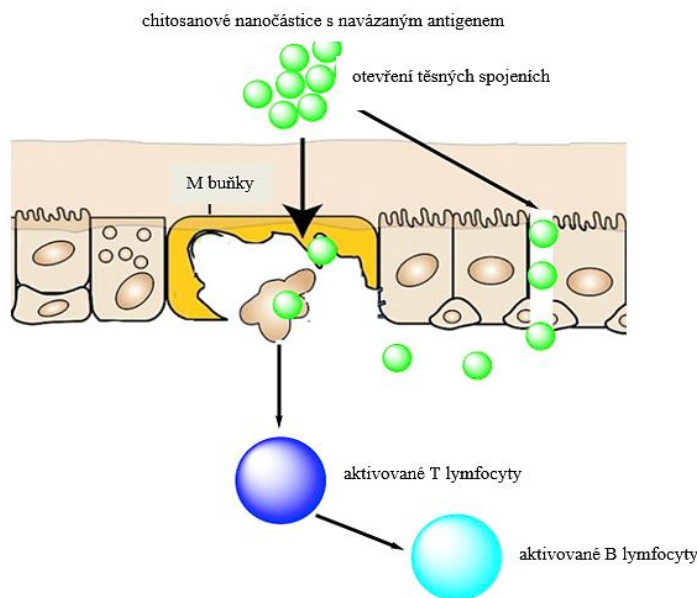
Obrázek 7: Schematické znázornění struktury nanočástic chitosanu a interakce s vrstvou hlenu.

Převzato a upraveno z: [114].

V roce 2002, Vila et al. [115], popsali úplně první aplikaci CS nanočástic pro transmukozální vakcinaci. Zjistili, že vakcína na bázi chitosanových částic obsahující tetanový toxoid, pokud je podávána intranazálně, vykazovala vysokou úroveň systémové i slizniční imunitní odpovědi ve srovnání s konvenční vakcínou na bázi tetanového toxoidu. Mukoadhezivní vlastnosti jsou přisuzovány polykationtové povaze polymeru, která vede k iontové interakci s negativně nabitým povrchem sliznice a hlenu. Adheze CS k hlenu je zprostředkována muciny, které při fyziologickém pH obsahují významné podíly negativně nabitě kyseliny sialové. Čím delší je proces mukoadheze CS-NP s hlenem, tím delší je setrvání částic na sliznicích. Tímto je docíleno delší interakce částic s M-buňkami, proniknutí do epitelových buněk nebo uvolnění antigenů [4].

Do nanočástic z chitosanu je možné enkapsulovat proteiny a ochránit je tak před denaturací a zachovat jejich biologickou aktivitu [116]. Částice z chitosanu mohou

být transportovány přes respirační epitelovou vrstvu na submukózu přes paracelulární a transcelulární dráhy, kde jsou absorbovány APC. Chitosan je schopen otevřít těsná spojení a umožnit tak paracelulární transport vakcíny přes mukózní transportní systém (Obrázek 8) [4].



Obrázek 8: Interakce chitosanových nanočástic s navázaným antigenem s imunitním systémem.
Převzato a upraveno z: [116].

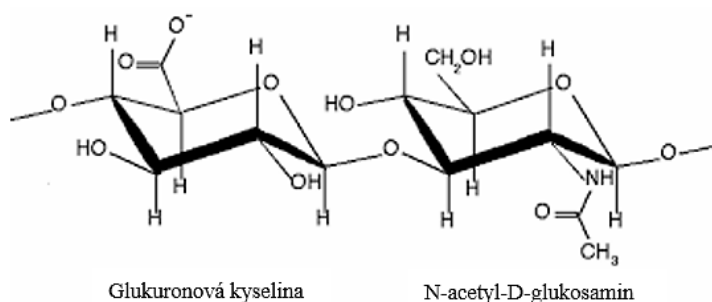
Kromě paracelulárních drah procházejí chitosanové nanočástice transcelulárně, a to dýchacím traktem. Zde M-buňky mechanicky absorbují a transportují nanočástice z respiračního lumenu do submukózy prostřednictvím endocytózy, zprostředkované kaveolami. V submukózních místech jsou přítomny APC, které mohou zpracovávat a prezentovat antigeny naivním T lymfocytům v sousedních slizničních lymfatických uzlinách. Stimulované T lymfocyty indukují aktivaci B lymfocytů, které se liší od plazmatických buněk vylučujících protilátky [116].

Vlastnosti chitosanu jsou známy již mnoho let a tento polymer se používá v oblasti zemědělství, průmyslu a medicíny [108]. V zemědělství je chitosan používán jako rostlinný antivirový přípravek či aditivum v kapalných vícesložkových hnojivech. Chitosan je také znám pro svou aplikaci jako filmotvorné činidlo v kosmetice (na pokožce, vlasech či nehtech vytváří spojitý film), barvivo na textilie či posilující přísada do papíru [117]. Významné použití je v oblasti biomateriálů, vzhledem k jeho imunostimulačním a antikoagulačním vlastnostem, antibakteriálnímu a antifungálnímu účinku a pro jeho působení jako promotor hojení ran v oboru chirurgie [110]. Antibakteriální aktivita CS je ovlivněna řadou faktorů (typ chitosanu, stupeň polymerace, a některé další fyzikálně-chemické vlastnosti) [117]. Závisí

také na molekulové hmotnosti a rozpouštědle, a je nepřímou ovlivněná hodnotou pH, přičemž vyšší aktivita je při nižší hodnotě pH [91]. CS vykazuje vyšší antibakteriální aktivitu vůči Gram pozitivním bakteriím než proti Gram negativním [110]. Limitujícím faktorem při aplikaci CS je jeho nízká rozpustnost ve vodném prostředí za neutrálních a alkalických podmínek a ve většině organických rozpouštědlech [111].

1.4.2.2 Aplikace kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová (HA) je glykosaminoglykan všudypřítomný ve tkáních lidského těla. HA je lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek (Obrázek 9) kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu vázaných $\beta(1,4)$ a $\beta(1,3)$ glykosidickými vazbami [118]. Je jednou z hlavních složek extracelulární matrice a podílí se na proliferaci a migraci buněk a na vaskularizaci tkání. Tyto biologické vlastnosti HA jsou způsobeny schopností polymeru interagovat s receptorem CD 44 na buněčném povrchu, což je jedním z hlavních důvodů častého použití v tkáňovém inženýrství [95].



Obrázek 9: Struktura kyseliny hyaluronové. Převzato a upraveno z: [118].

Kyselina hyaluronová se využívá k potažení CS-NP pro její vlastnosti, které zlepšují cílení buněk. Pokud je CS hlavní složkou částic, mají tyto systémy kationtový povrch, který významně snižuje dobu jejich cirkulace a biologickou dostupnost při expozici biologickému prostředí. Pokud jsou však tyto částice obaleny aniontovým polysacharidem, jako je HA, sníží se jak rychlost adsorpce proteinu, tak rychlost absorpce makrofágy [119]. Kromě biologické rozložitelnosti, biokompatibility a mukoadhezivních vlastností je HA spojena s mnoha dalšími benefity, jako je zlepšení regenerace epitelálních buněk rohovky a spojivky či je zapojena do receptorem zprostředkované internalizace a biodegradace hyaluronanu. Vrstva HA na CS-NP urychluje jejich buněčný příjem pomocí receptorem zprostředkované endocytózy [120].

1.4.3 Aplikace lipidů v slizničních vakcínách

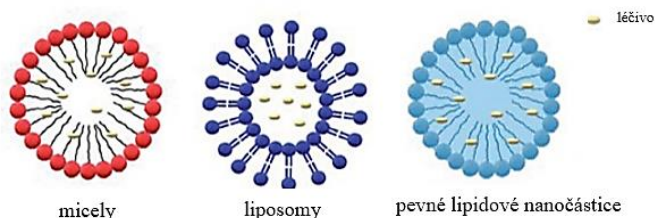
Polymerní micely, liposomy, virosomy a pevné lipidové částice se osvědčily při parenterální (intramuskulárním nebo subkutánním) vakcinaci. Tyto formy vakcín byly navrženy tak, aby napodobovaly biofyzikální a biochemické vlastnosti patogenů, a tak zajišťovaly účinné dodávání Ag na sliznici a indukci lokálních a systémových imunitních odpovědí [121]. Částice na bázi lipidů splňují požadavky na vyšší účinnost, bezpečnost, nízkou dávku antigenu a snadnou logistickou manipulaci [122].

1.4.3.1 Polymerní micely

Micely představují asociovaný nebo amfifilní koloidní systém, jenž patří do velké skupiny disperzních systémů. Sestávají z dispergované fáze, která je distribuována v kontinuální fázi nebo z disperzního média, mající velikost částic v rozmezí 5 až 100 nm [123]. Koloidní disperze zaujímají místo mezi molekulárními disperzemi s velikostí částic pod 1 nm a hrubými disperzemi s velikostí částic větší než 0,5 μm . Polymerní micely jsou termodynamicky stabilnější než micely a mají schopnost nést více než jeden antigen. Toho je dosaženo funkcionalizací polymerních micel, které poskytují velké množství míst pro vazbu antigenu. Funkcionalizované polymerní micely tedy nacházejí velké množství aplikací při dodávání vakcíny [124]. Polymerní micely získaly pozornost efektivních nanonosičů kvůli jejich snadné přípravě, funkčnosti, bohaté chemické rozmanitosti a upravitelným fyzikálním vlastnostem. Kromě toho mají řadu příznivých vlastností, jako je solubilizace hydrofobních léčiv, biokompatibilita a prodloužená systémová cirkulace [125].

1.4.3.2 Pevné lipidové nanočástice (SLN)

Využití lipidových nanočástic (Obrázek 10) v posledních desetiletích vzrostlo, a to například při diagnostických či zobrazovacích metodách, dodávání léků a genů [126].



Obrázek 10: Obecná struktura běžných nanometrických systémů používaných při transportu léčiv (micely, liposomy a pevné lipidové nanočástice). Převzato a upraveno z: [105].

Jedná se o hydrofobní nano-nosiče, které jsou vyrobeny z pevného lipidového jádra potaženého monovrstvou fosfolipidů a dispergovaného ve vodném systému. Pevné lipidové

nanočástice mají podobnou strukturu jako nanoemulze, které se sestávají z tekutého lipidového jádra. Výhodu oproti nanoemulzím je jejich velmi pomalá degradace v těle, která může být ještě snížena použitím stericky stabilizujících povrchově aktivních látek [127]. V roce 2007 zveřejnili Rao a Koteswara studii o polymerních SLN pro slizniční dodávku antigenu [126]. SLN vykazují vysokou fyzikální stabilitu, mohou sloužit jako ochrana labilních léčiv proti degradaci a vynikající snášenlivost *in vivo* díky jejich biokompatibilitě. Tyto systémy však obecně vykazují nízkou užitkovou kapacitu léčiva a vysoké vypuzování léčiva během skladování v důsledku výskytu polymorfních přechodů lipidových molekul směrem ke stabilnějším konfiguracím během skladování [127].

1.4.3.3 Liposomy

Liposom se tvoří v různých velikostech s unilamelární nebo multilamelární konstrukcí. Jsou to globulární lipidové dvojvrstvy o průměru 50 – 1000 nm, která slouží jako vhodná transportní vehikula pro biologicky aktivní sloučeniny [128]. Široce se využívají k enkapsulaci proteinů a DNA. Liposomy jsou definovány jako fosfolipidové vezikuly sestávající z jednoho nebo více koncentrických lipidových dvojvrstev obklopujících jednotlivé vodné prostory [129]. Liposomy jsou složeny z přirozeně se vyskytujících a/nebo syntetických fosfolipidů, jako je fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a fosfatidylglycerol [130]. Liposomy jsou prospěšné pro stabilizaci terapeutických sloučenin, překonávání překážek absorpce buněk a tkání a zlepšování biodistribuce sloučenin na cílová místa *in vivo* [129]. Jedinečná schopnost liposomálních systémů vázat jak lipofilní, tak hydrofilní sloučeniny, umožňuje enkapsulovat různorodou škálu léčiv. Hydrofobní molekuly jsou vloženy do dvouvrstvé membrány a hydrofilní molekuly mohou být zachyceny ve vodném centru [129].

Náboj liposomu může hrát důležitou roli v jeho osudu. Liposomy mohou být buď negativně, neutrálně nebo pozitivně nabitě, v závislosti na aditivech a složení. Mukoadheze je podporována kladně nabitými částicemi, které interagují se záporně nabitým hlenem. Například elektrostatické interakce mezi kationtovými lipidy a nosní sliznicí podporují prodlouženou dobu kontaktu s tkání, vyšší lokální koncentraci, a tím zlepšenou penetraci liposomů [128]. Kationtové částice lépe interagují se záporně nabitými buněčnými membránami (jako jsou membrány M-buněk a enterocytů), čímž omezují clearance vakcín, zlepšují vychytávání vzorků (prostřednictvím endocytózy nebo fúze), a zlepšují absorpci DC [121]. Kationtové částice však mohou mít na cílových buňkách cytotoxicitu závislou na náboji;

proto je třeba pečlivě definovat hustotu kationtových lipidů uvnitř částic a dosáhnout těsné rovnováhy mezi silnou adhezí a bezpečností [129].

Teploty fázových přechodů (TM; *transition temperatures*) fosfolipidů jsou zvláště důležité. Lipidy existují v kapalném stavu ($T > T_M$) nebo v gelovém stavu ($T < T_M$), v závislosti na jejich teplotě. Kapalný stav lipidů je propustnější pro vodu a může být využit k zapouzdření léčiv již během produkce liposomů. Při tělesné teplotě ($T \approx 37\text{ °C}$) kapalný stav způsobí, že liposomy se stávají netěsné a zapouzdřené léky tak s velkou pravděpodobností uniknou ještě před dosažením místa účinku. Při fyziologických podmínkách je ke stabilizaci liposomů žádoucí výběr fosfolipidů v gelovém stavu [130]. Liposomy mohou být použity k cílení přesných buněk připojením fragmentů aminokyselin, jako jsou protilátky, proteiny či navázáním vhodných fragmentů, které cílí na specifické receptory. Liposomy jsou zvláště účinné při léčení nemocí, které mají vliv na fagocyty imunitního systému, neboť mají sklony se v nich akumulovat [128]. Imunizační studie s vakcínou na bázi liposomálního tetanického toxoidu ukázala, že nasální cesta je nejvhodnější pro mukózní vakcinaci [131]. Průmyslové aplikace zahrnují použití liposomů jako vehikulů pro transport léčiv v medicíně, adjuvans ve vakcinaci, zesilovače signálu/nosiče v lékařské diagnostice a analytické biochemii, solubilizátory pro různé složky, jakož i podpurné matrice pro různé látky a zesilovače penetrace v kosmetice [128]. Výhody a nevýhody použití liposomů v podávání látek jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3: Výhody a nevýhody liposomů. Převzato a upraveno z: [128].

Výhody	Nevýhody
Liposomy mohou tvořit komplex jak s negativně, tak s pozitivně nabitými molekulami.	Výrobní náklady jsou vysoké.
Liposomy ochraňují DNA před degradačními procesy.	Možný únik a fúze zapouzdřeného léčiva/molekul.
Liposomy mohou nést velké úseky DNA (možná stejně velké jako chromozom).	Některé fosfolipidy podléhají oxidačním a hydrolytickým reakcím.
Liposomy mohou být cíleny na specifické buňky nebo tkáň.	Krátký biologický poločas.
	Nízká rozpustnost.
	Méně stabilní (chemická nestabilita fosfolipidů).

1.4.3.1 Virosomy

Virosomy jsou speciální kategorií liposomů, kde část obsahu lipidů pochází z virových složek, které se samy sestavují do organizované 3D struktury, která napodobuje antigenní strukturu původního viru. Virosom je inovativní hybridní systém pro cílený transport léčiv s výhodami virových i nevirálních vektorů. Představuje novou formu prezentace vakcíny,

kteřá velmi napodobuje nativní virus. Virosohy jsou virové částice, které sestávají z rekonstituovaných virových obalů (povrchový glykoprotein). Postrádají genetický materiál nativního viru, tudíž jsou obecně bezpečné a imunogenní bez dalšího přidávání adjuvans (ačkoli přidání imunopotenciačních činidel zlepšuje jejich účinnost) [132]. Virosohy se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy s vyčnívajícími virovými povrchovými glykoproteiny. Podle studie [133] virosohy produkované z obaleného chřipkového viru solubilizací detergentem vyvolaly silnější reakce Th1 ve srovnání se subjednotkovou vakcínou. Uvnitř virosomu je dutina, kterou lze využít k přenosu organických látek (nukleových kyselin, peptidů, proteinů) na cílová místa. Na trhu je v současné době k dispozici řada profylaktických a terapeutických produktů na bázi virosomů s vysokým profilem bezpečnosti [132]. V současné době jsou vakcíny proti chřipce založené na virozomech a ISCOM ve vývoji pro nazální aplikace. Pro lidské použití jsou vakcíny na bázi virosomů proti hepatitidě A (Epxal) a chřipce (Inflexal V). Další vakcíny založené na této technologii byly testovány v 1. fázi klinické studie na malárii a chřipku [122].

1.4.4 Další polymerní částicové systémy

1.4.4.1 Niosomy

Niosomy jsou vícevrstevné vezikulární struktury neiontových povrchově aktivních látek amfifilní povahy. Jsou podobné liposomům (liší se fosfolipidovou složkou) [134]. Niosomy překonávají všechny nevýhody liposomů [135]. Niosomy působí jako vakcinační adjuvans a podporují imunitní odpovědi Th1 při intraperitoneálním podání myším [136].

Rentel a kol. [132] vytvořili různé lyofilizované niosomové přípravky sestávající z esterů sacharózy, cholesterolu a diacetylfosfátu. Do dvou niosomů s různým složením zapouzdřili ovalbumin pro perorální podání u myší. Následně porovnávali imunitní odpověď a dospěli k závěru, že samotné podávání ovalbuminu a prázdných niosomů nestimulovalo podobnou imunitní odpověď jako ovalbumin zapouzdřený v niosomu.

1.4.4.2 Bilosomy

Bilosomy jsou uzavřené dvouvrstvé struktury neiontových povrchově aktivních látek, které navíc obsahují žlučové soli. Bilosomy představují klíčový pokrok v perorálním podání vakcíny, neboť jsou odolnější vůči narušení žaludeční kyselinou i enzymy [138]. Bilosomy se liší od liposomů a niosomů ve složení, chemické stabilitě a podmínkami skladování. Bilosomy byly vyvinuty, aby se předešlo problémům během transportu v GIT, neboť že nejen brání degradaci antigenů, ale také zlepšují penetraci sliznicí. Vakcína na bázi bilosomu vyvolaly

jak systémovou, tak slizniční imunitní odpověď, která byla ekvivalentní imunitní reakci produkované subkutánním způsobem aplikace [139]. V roce 2006 Mann et al, vytvořili novou formulaci vakcíny na bázi bilosomu, která obsahovala tetanický toxoid, za použití vezikul pro orální aplikace, které obsahují žlučové soli [140]. Hlavní výhodou bilosomů pro orální imunizaci je jejich snadná aplikace, a také to, že jsou antigeny i v menším množství účinné. Další výhodou je, že může být vyvolána buněčná a humorální imunita; mohou být transportovány i menší a slabší antigeny a také se projevila lepší poddajnost pacienta. Velikost bilosomů je možné modifikovat a ovlivnit tím kontrolu nad imunitní odpovědí [138].

1.4.4.3 Nanoemulze

Emulze je heterogenní, dvoufázový, termodynamicky nestabilní kapalný systém, ve kterém jsou dvě nemísitelné kapaliny mísitelné pomocí třetího činidla zvaného emulgátor. Pokud je globulární velikost rozptýlené fáze v rozsahu nanometrů, nazývá se nanoemulze. Vakcíny na bázi nanoemulzí se skládají z emulze (vodná fáze, olejová fáze a emulgátor) a imunogenu (protein/peptid, polysacharid/DNA) [141]. Nanoemulzní systém je velmi užitečný jako depotní formulace vakcíny pro trvalé uvolňování antigenu. Antigeny jsou zabudovány do vnitřní vodné fáze. Freundovo adjuvans založené na emulzi se stále používá jako „zlatý standard“ při vývoji nových vakcínových adjuvans [66]. Nanoemulze byly použity v souvislosti s RNA vakcínami. Ve studii Brito et al [142] byl vyvinut kationtový nanoemulzní transportní systém k dodání mRNA vakcíny o velikosti 9 kb. Podání tohoto transportního systému bylo schopné indukovat velkou imunitní odpověď u myší, potkanů, králíků a nehumánních primátů.

1.4.4.4 Dendrimery

Dendrimery jsou syntetické, vysoce rozvětvené makromolekulární sloučeniny, skládající se z vnitřního jádra s výběžky [143]. Termín „dendrimer“ je odvozen z řečtiny „*dendra*“ = strom a „*meros*“ = části; graficky popisuje strukturu této třídy makromolekul, jenž mají vysoce rozvětvené 3D výběžky, které připomínají architekturu stromu. Dendrimer se skládá ze tří hlavních strukturních komponent: multifunkčního centrálního jádra, výběžků a povrchových skupin [144]. Mají dobře definované nanostruktury s globulárními tvary, vysokou hustotou povrchové funkčnosti a omezenou imunogenicitou. V závislosti na polymeru jsou dendrimery hydrofilní nebo hydrofobní povahy. Antigeny mohou být začleněny do jádra, nebo jsou připojeny na periferii. Dendrimery se syntetizují pomocí

polymerů, jako je poly-(N-isopropylakrylamid), polyamidoamin, poly-(L-glutamová kyselina), polyethylenimin, polypropylenimin a polyetylenglykol [143]. Ve srovnání s tradičními lineárními a rozvětvenými polymery mají dendrimery pro biomedicínské aplikace několik výhod. Jednou z výhod je vynikající monodisperzita umožňující reprodukovatelné farmakodynamické a farmakokinetické chování, zatímco polydisperzita tradičních polymerů způsobuje v těchto aspektech při klinických pokusech vážná omezení [145]. Další výhodou je přesně definovaná, struktura a molekulová hmotnost dendrimer, jež vyhovuje různým aplikacím a vědci si tak mohou vybrat potřebnou konkrétní generaci dendrimer [146]. Vysoká hustota povrchových funkčních skupin na dendrimerech zajišťuje synergickou/multivalentní vazbu při rozpoznávání ligandu/receptoru [147]. Výhodou je také globulární struktura dendrimerů s možnou kontrolou velikostí, která umožňuje napodobovat proteiny bez imunogenicity [148]. Dendrimery mají také vynikající rozpustnost a vysokou reaktivitu, a tak mohou být modifikovány různými ligandy (např. zobrazovací sondy a biokompatibilní ligandy pro specifické terapie) [149]. Mohou být široce používány ke zvýšení absorpce buněk, biologické dostupnosti, terapeutické účinnosti, intracelulárního uvolňování a ke snížení systémové toxicity, clearance a degradace nekovalentně nebo kovalentně vázaných léčiv [145].

1.5.1 Modifikace vlastností polymerů

Prostřednictvím modifikace vlastností může být uvolňování léčiva z částic řízeno tak, aby bylo dosaženo požadované terapeutické koncentrace po požadovanou dobu. Pro cílený transport mohou být nanostruktury konjugovány s cílovými skupinami látek. Vazba mezi polymerem a účinnou látkou může být změněna za účelem kontroly místa a doby trvání, po kterou je léčivo uvolňováno. Vazba vzniká začleněním aminokyselin, lipidů, peptidů nebo malých řetězců jako distančních molekul. Cílení léků je rozhodující obzvláště v chemoterapii, kde může být systém cíleného transportu léků zaměřen pouze na maligní nádor, zatímco by měl chránit zdravé buňky před rovnoměrnou distribucí chemoterapeutik v těle a jejich škodlivými účinky. Použití nanostruktur, jako jsou polymerní nanočástice, je neinvazivní metoda k prostupu hematoencefalické bariéry pro léčbu neurodegenerativních poruch, cerebrovaskulárních a zánětlivých onemocnění [91].

Nanotechnologie může být použita k přeformulování stávajících léčiv, čímž by se prodloužila životnost produktů, zvýšila by se jejich výkonnost, došlo by ke zlepšení přijatelnosti zvýšením účinnosti a také ke zvýšení bezpečnosti a adherenci u pacientů, a nakonec by došlo ke snížení nákladů na zdravotní péči. Nanotechnologie mohou také zvýšit výkonnost

léků, které nejsou schopny absolvovat fáze klinického testování [92]. Zapouzdřením vakcínových antigenů do mukoadhezivních nanočástic jsou antigeny chráněny před enzymatickou degradací, a také se zvýší jejich doba působení zvyšující absorpci antigenu [4].

1.6 Vlastnosti částic pro *in vivo* studie

Fyzikální a chemické vlastnosti částic mají velký dopad na jejich molekulární biologii a systémové aktivity. Proto je nutné charakterizovat fyzikálně-chemické vlastnosti (tj. velikost částic, tvar, struktura, chemie, krystalografie atd.), aby byly částice vhodné pro použití ve farmaceutických aplikacích [76]. Charakterizace částic může být prováděna pokročilými mikroskopickými metodami, jako je skenovací elektronová mikroskopie (SEM), transmisní elektronová mikroskopie (TEM) či mikroskopie atomárních sil (AFM). Elektronové mikroskopické techniky jsou velmi užitečné při zjišťování celkového tvaru polymerních nanočástic, který může určovat jejich toxicitu. Další možnost charakterizace nanočástic poskytuje infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací, při které se zjišťují infračervená spektra jednotlivých vzorků částic s použitím Fourierovy transformace. Další technikou, kterou lze charakterizovat nanočástice, je diferenciální skenovací kalorimetrie, jež studuje tepelné projevy fyzikálních dějů probíhajících v materiálu [150].

Tělesné tekutiny včetně krve jsou složitou směsí různého množství látek a faktorů, jako jsou růstové faktory, proteiny, vitaminy, hormony, stopové prvky a další důležité i neesenciální složky, tudíž je třeba posoudit koloidní stabilitu nanočástic. Přípravky s vyšší viskozitou zůstávají delší čas v kontaktu se sliznicí, což zvyšuje absorpci. Zároveň vysoká viskozita usnadňuje prostupnost léčivé látky. Je tedy důležité optimalizovat nejen velikost, tvar a povrchové vlastnosti nanočástic. Optimalizace je možná například změnou koncentrace síťovacích činidel, teploty, rychlosti míchání či například změnou metody sušení. Tyto praktické problémy musí být překonány, než mohou být nanočástice klinicky či komerčně dostupné [76].

1.6.1 Hydrodynamická velikost částic

Hydrodynamická velikost polymerních a koloidních částic (včetně distribuce jejich velikostí) je rozhodujícím faktorem určujícím jejich vlastnosti a bezpečnost v biologických systémech, zejména pokud se navrhuje použití parenterální cestou. Velikost částic ovlivňuje oběh a orientaci částic v krevním řečišti, prostupování léčiv fyziologickými bariérami, specifickou lokalizaci pro konkrétní místo či buňku, a dokonce indukci buněčných

odpovědí. Nanočástice se chovají odlišně s dramaticky se snižující velikostí částic v závislosti na objemu. Údaje o distribuci velikosti částic se uvádí na základě frekvence intenzity [76].

1.6.1.1 Metody stanovení velikosti částic

V současné době je nejrychlejší a nejoblíbenější metodou stanovení velikosti částic **fotonová korelační spektroskopie (PCS)** nebo **dynamický rozptyl světla (DLS)** [151].

Dynamický rozptyl světla (také známý jako kvazi elastický rozptyl světla) zkoumá distribuci velikosti malých částic, molekul nebo polymerů v měřítku menším než submikrony až do jednoho nanometru v roztoku nebo suspenzi pomocí monochromatického zdroje světla, např. laseru. Principem DLS je sledování časové fluktuace elastické rozptylové intenzity světla, tj. Rayleighův rozptyl, indukovaný Brownovým pohybem částic/molekul o velikosti mnohem menší, než je dopadající světelná vlnová délka, při pevném úhlu rozptylu [167]. Fotonový detektor měří intenzitu Dopplerova posunu dopadajícího záření, které je časově závislé na fluktuacích. Stopa fluktuace intenzity zahrnuje směs konstruktivních a destruktivních interferencí rozptýleného světla, díky nimž lze velikost částic odvodit z analýzy autokorelační funkce závislé na pohybu pomocí Stokesovy-Einsteinovy rovnice. Stokesova-Einsteinova rovnice stanovuje časový horizont difúze částic s ekvivalentním sférickým hydrodynamickým průměrem částic. Tento vztah závisí jak na viskozitě roztoku, tak na teplotě, při které se rozptýlené světlo shromažďuje [179].

Pro fyzikálně-chemickou charakterizaci nanomateriálů patří mezi hlavní přednosti DLS jeho neinvazivní způsob, krátké trvání experimentu (v minutách), přesnost při určování hydrodynamické velikosti monodisperzních vzorků, možnost měření zředěných vzorků, analyzování vzorků v širokém rozmezí koncentrací a detekce malých množství vzorků s vyšší molekulovou hmotností, spolu s nižšími náklady na zařízení a reprodukovatelnějším měřením než jiné metody [180]. Nevýhodami DLS jsou obtížnost korelace velikostních frakcí s konkrétním složením, pokud jsou přítomna určitá množství agregátů, prachové částice zasahující do intenzity rozptylu a relativně malý rozsah velikostí částic nebo molekul (1 nm – 3 μm), ačkoli omezení měřítka není ve skutečnosti úskalím pro charakterizaci nanomateriálů. Jednou z výzev většiny nanomateriálů v přirozeném prostředí je dualita fyzikálních a chemických charakteristik v případě, že přecházejí z hydrofobní formy na polární (po expozici vodě). Dalším způsobem měření velikosti částic může být například využití centrifugační fotosedimentace na centrifugačním automatickém částicovém analyzátoru.

Nejjednodušší způsob pro zjišťování velikosti, tvaru a povrchových charakteristik je však využití skenovacího elektronového mikroskopu [181].

1.6.1.2 Vliv velikosti částic na jejich biologický osud

Velikost je důležitým faktorem při navrhování slizničních vakcín a cílení absorpce na indukční imunitní místa za účelem generování odpovědí T a B lymfocytů. Velikost částic ovlivňuje lokalizaci tkáně a difúzi přes hlen. Vaskulární a lymfatické systémy jsou zodpovědné za filtraci a odstraňování cizorodých látek a chemikálií. Aby se získal přístup k epitelu, může mít na penetraci složek vakcíny vliv jak viskozita, tak velikost pórů hlenu. Průměrná velikost pórů v hlenu je mezi 200 a 500 nm (např. v cervikovaginálním a tenkém střevním hlenu). To naznačuje, že částice menší, než tato mezní hodnota volně difundují přes hlen, zatímco u větších trvá dosažení epitelu více času, nebo ho nikdy nedosáhnou [121].

Osud částic dodávaných **intranasální cestou** je ovlivňován jejich velikostí, přičemž částice menší než 5 μm jsou transportovány přes nosní sliznici do dalších částí dýchacího systému pro dodávku k BALT. Naproti tomu větší částice přesahující 10 μm jsou přijímány alveolárními makrofágy a dendritickými buňkami [182].

Při **orálním podání** enterocyty prostřednictvím endocytózy snadno vychytávají rozpustné částice o velikostech kolem 20 – 40 nm. Malé částice (do 200 nm) jsou snímány jako viry a jsou přijímány receptorem zprostředkovanou endocytózou, což vede k převládající reakci T lymfocytů. Zatímco větší částice (více než 500 nm) jsou přijímány mikropinocytózou nebo fagocytózou, aby přednostně indukovaly reakce protilátek [92]. Zatímco nanočástice vedou převážně k odpovědím zprostředkovaným T lymfocyty, větší mikročástice jsou účinnější při vyvolávání humorální odpovědi. Částice větší než 100 nm jsou vychytávány M-buňkami. Částice o velikosti 200 nm nebo větší mají tendenci aktivovat lymfatický systém a jsou rychleji eliminovány z oběhu [121].

Optimální velikost nanočástic je tedy přibližně 100 nm. Při této velikosti může nanočástice procházet HEB s dostatečným množstvím léku. Děje se tak v důsledku vysokého poměru povrchu k objemu a může se tak vyhýbat okamžité clearanci lymfatickým systémem, zejména retikuloendoteliálním systémem, což způsobuje, že lék nedokáže udržet terapeutickou koncentraci v krvi nebo být transportován do cílových tkání nebo buněk, které nejsou součástí retikuloendoteliálního systému [92]. Velká plocha nanočástic exponenciálně zvyšuje počet atomů nebo molekul na povrchu pro získání vysoké reaktivity částic. Četné studie o velikosti a tvarově závislé toxicitě částic prokázaly biokinetické a biologické dopady

nanočástic. Vykazovaly změny ve vychytávání buněk, adsorpci proteinů, akumulaci v organelách a distribuci v celém těle [76]. Jedním z důvodů těchto účinků je korelace mezi velikostí částic a povrchovou plochou. Pokud se velikost částic zmenší, jejich poměr povrchu k objemu se zvětší. To znamená, že větší množství léku je blíže k povrchu částice ve srovnání s větší molekulou. Léčivo přítomné na povrchu či v blízkosti povrchu částice pravděpodobně vede k rychlejšímu uvolnění léku. Naopak, léčivo se pomaleji uvolňuje uvnitř větších částic. Je tedy prospěšné vytvořit systémy nanočástic s velkým poměrem povrchu k objemu; vždy však musí být kontrolována jejich toxicita [92]. Malá velikost a velká povrchová plocha částic může vést k jejich agregaci, což znesnadňuje citlivé zacházení s nanočásticemi v kapalných a pevných fázích a má také za následek omezené vkládání genů/léčiv a jejich následné uvolňování. Pozitivně nabitě a stabilní submikročástice s velikostí v rozmezí 200 – 400 nm a indexem polydisperzity $< 0,1$ vykazují podle studie [76] dobré dodání a posílení imunitní odpovědi.

1.6.2 Zeta potenciál částic

Difúze přes hlen není ovlivněna pouze velikostí částic či antigenu nebo pórů hlenu, ale také chemickými vlastnostmi, jako je povrchový náboj částic. Charakterizuje tendenci ke shlukování částic a odráží jejich dlouhodobou stabilitu (např. při skladování koloidních suspenzí) [2]. Jelikož přímé měření povrchového náboje je velmi obtížné, využívá se jako míra povrchového náboje definovaných částic veličina zvaná zeta potenciál. Zeta potenciál je tedy měřítkem povrchového náboje částic. Povrchový náboj částic ovlivňuje fyzikální stabilitu a redispersovatelnost disperze polymeru, jakož i jejich účinek *in vivo* [153]. Proto je dalším parametrem měřeným technikami rozptylu světla, jako je elektroforetický rozptyl světla, který se také označuje jako laserová Dopplerova mikroeletroforéza, a to i přes výskyt elektroosmotických účinků, které snižují přesnost a reprodukovatelnost. Obvykle se vyjadřuje jako elektroforetická mobilita $[(\mu\text{m}/\text{S})/(\text{V}/\text{cm})]$ nebo se převádí na potenciál zeta (mV). Podobně jako jednoduché ionty, také definované částice v disperzi, jež mají povrchový náboj, vytváří v okolním prostředí elektrické pole. Vlivem tohoto elektrického pole dochází k navázání volných iontů opačné polaroty z disperze k povrchu částice. Okolo nabitě částice vzniká tenká vrstva nazývaná elektrická dvojvrstva. Zeta potenciál je elektrostatický potenciál v mezifázové dvojvrstvě dispergované částice nebo kapičky versus bod v kontinuální fázi od rozhraní. Jinými slovy, potenciál zeta je potenciální rozdíl mezi mobilním disperzním médiem a stacionární vrstvou disperzního média připojeného k dispergované částici. V elektrické dvojvrstvě existuje

oblast iontové atmosféry, jež se s částicí pohybuje a vrstva, která se nepohybuje. Zeta potenciál se tedy vztahuje přímo k pohyblivosti nabitě částice v elektrickém poli. Nulová hodnota zeta potenciálu je vyjádřena hodnotou izoelektrického bodu (pI), a proto musí být posuzována také hodnota pI vybraného ligandu před vazbou s částicovým nosičem [178]. Zeta potenciál závisí na iontové síle, pH a typu iontového média, ve kterém jsou částice suspendovány a na teplotě [151]. Zeta potenciál lze měřit dynamickým rozptylem světla. Měření zeta potenciálu se provádí pomocí elektrického náboje procházejícího vzorkem ve složené kapilární průtokové komoře. Částice, které udržují vysoký zeta potenciál jsou přitahovány k elektrodě opačného náboje. Pro fyzicky stabilní suspenzi stabilizovanou pouze elektrostatickým odporem je nutný zeta potenciál ± 30 mV. Emulze s vysokým potenciálem zeta (ať už negativním nebo pozitivním) jsou elektricky stabilizovány, zatímco emulze s nízkým potenciálem zeta mají tendenci agregovat, koagulovat či flokulovat, což může vést ke špatné fyzické stabilitě částic. Částice s potenciálem zeta kladnějším než +30 mV nebo zápornějším než -30 mV jsou považovány za stabilní [152]. V případě, že je zeta potenciál emulze vysoký, odpudivé síly převyšují atraktivní síly, což vede k relativně stabilnímu systému. Zeta potenciál může také předpovědět rozsah povrchové hydrofobicity či poskytnout informace o povaze materiálu zapouzdřeného v částicích či adsorbovaného na povrchu [153].

1.6.3 Povrchová hydrofobicita

Povrchová hydrofobicita je stěžejní vlastností povrchů částic, která může ovlivnit chování NP ve vodním prostředí a potenciálně rozhodnout o osudu a transportu částic. Hydrofobicita je důležitým parametrem, který přispívá ke stanovení biologického a environmentálního osudu částic i jejich potenciální toxicity [154]. Hraje významnou roli biologických procesech, jako je adsorpce bílkovin, interakce s biologickými membránami, buněčné vychytávání a imunitní reakce. V současné době je k dispozici pouze několik metod pro charakterizaci hydrofobicity nanomateriálů a žádná z nich neumožňuje u všech typů nanomateriálů úplnou charakterizaci a kvantifikaci tohoto klíčového parametru. Většina z těchto technik je navíc založena na nákladných a časově náročných analytických technikách. Povrchová hydrofobicita může být stanovena hydrofobní interakční chromatografií, bifázickým dělením, sledováním kinetiky adsorpce (měření počtu částic vázajících se na různé kolektory jako funkce času pomocí mikroskopie tmavého pole), měřením kontaktního úhlu atd. V poslední době je v literatuře uvedeno několik sofistikovaných analytických technik pro povrchovou analýzu nanočástic. Rentgenová fotonová korelační

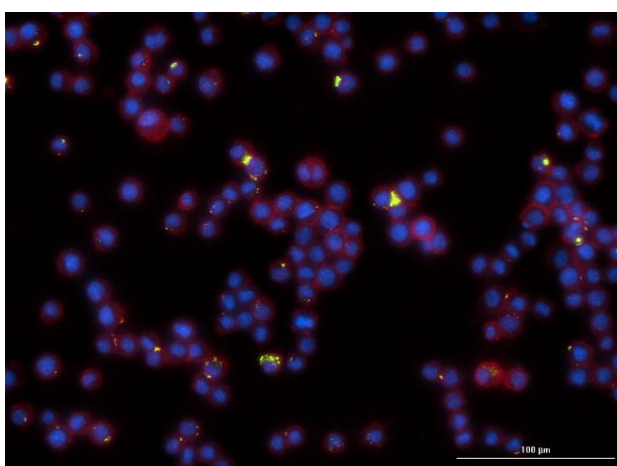
spektroskopie umožňuje identifikaci specifických chemických skupin na povrchu částic [153]. Hydrofobní a elektrostatické interakce zprostředkované částicemi agregují mikrostrukturu hlenu a brání difúzi vakcín, zatímco hydrofilní a neutrální formulace vakcíny podporují penetraci hlenu [121].

1.7 Značení částic pro *in vivo* zobrazovací studie

Biomedicínské zobrazovací techniky („*bioimaging*“) zahrnují širokou škálu neinvazivních zobrazovacích metod, kterými lze získat anatomické a fyziologické informace. Tyto zobrazovací techniky umožňují vizualizaci biologických procesů na mikroskopické a makroskopické úrovni. Biomedicínské zobrazování nalézá využití od buněčného sledování až po skenování celého těla, nejčastěji pro diagnostické účely. Různé zobrazovací techniky využívají různé typy záření elektromagnetického spektra. V současné době je spíše zájem o zobrazovací techniky na principu neionizujícího záření, které mohou nabídnout vylepšenou detekci či rozsáhlejší informace o biologických procesech [155].

1.7.1 Fluorescenční zobrazovací techniky

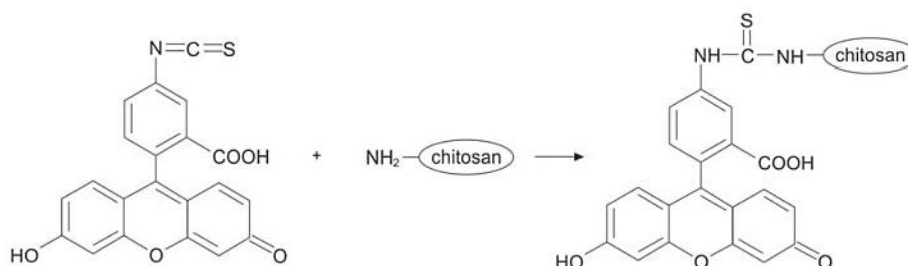
Fluorescenční zobrazovací techniky mají vysokou citlivost, nízké náklady a časovým rozlišením se staly nepostradatelnými pro aplikace biomedicínského zobrazování. Fluorescenční sondy emitují ve spektrálních oblastech (650 – 1000 nm) červené a blízké infračervené záření (NIR) [156]. Fluorescenčně značené částice mohou poskytnout rychlé, jednoduché a citlivé prostředky pro fluorimetrickou kvantifikaci částic asociovaných s buňkami (Obrázek 11).



Obrázek 11: Makrofágy linie J774.2 a chitosanové částice značené FITC. Barvení Phalloidin a Hoechst – buněčná jádra (Hoechst – modře), filamenta (Phalloidin – červeně)
Autor: Mgr. Radek Sleha, Ph.D., Univerzita obrany Hradec Králové.

Kvantifikace částic je možná pouze v případě použití kalibrační křivky připravené stejným způsobem jako vzorky [157]. Fluorescenčně značené polymery poskytují informace (o místech působení a dynamice), které je nemožné nebo velmi obtížné získat pomocí neznačených materiálů. Důležitým prvkem je, aby fluorescenční marker nebyl z částic zřetelně disociován, aby se během následných experimentů se zpracováním, uskladněním a absorpcí udržovala stechiometrie. Je známo, že markery snadno disociují, pokud jsou adsorbovány na povrch předem vytvořených částic [155]. Polymery konjugované s fluorescenční molekulou jsou univerzálními materiály pro biologické zobrazování, díky jejich přizpůsobeným absorpčním a emisním spektrům a aplikacím při fluorescenčním i fotoakustickém zobrazování. Značení biomolekul fluorescenčně je tedy důležitou metodou pro detekci cílových analytů nejen v oblasti biologie a medicíny [158]. Značené částice slouží například ke studiu absorpce a asociace částic s buňkami imunitního systému.

Chitosan může být značen např. fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC). Principem je reakce (Rovnice 1) mezi isothiokyanátovou skupinou FITC a primární aminovou skupinou chitosanu. Tento druh reakce je používán také ke značení proteinů.



Rovnice 1: Reakční mechanismus mezi FITC a chitosanem. Převzato a upraveno z: [159].

FITC je jednou z nejpopulárnějších fluorescenčních sond. Isothiokyanátový derivát fluoresceinu se syntetizuje modifikací jeho spodního kruhu v poloze 5 nebo 6-uhlíku. Dva výsledné isomery jsou téměř identické ve své reaktivitě a spektrálních vlastnostech, včetně excitačních a emisních vlnových délek a intenzit. Jejich chemické rozdíly však mohou ovlivnit separaci modifikovaných proteinů od nadměrného činidla nebo analýzu značených molekul elektroforézou. Z tohoto důvodu většina výrobců purifikuje derivát uhlíku-5 jako vybrané činidlo FITC [160].

Ve studii z roku 2019 [157] byly pro sledování míry interakce a pohlcení chitosanových částic myší makrofágovou buněčnou linií RAW 264.7 použity částice značené pomocí FITC. Pro detekci nanočástic intracelulárně byly buňky značeny Lysotracker Red. Práce tak potvrdila, že se částice hromadily v kyselých endolysosomech.

Chitosanové nanočástice značené FITC mohou emitovat fluorescenci s vysokou intenzitou a stabilitou. Kvůli dobré biokompatibilitě a netoxickým vlastnostem mohou fluorescenční chitosanové nanočástice najít uplatnění v biologickém barvení, enzymově vázané imunoanalýze (ELISA) a biočipech *in vivo* i *in vitro* [160]. Organická fluorescenční barviva široce používána v lékařské diagnostice a molekulárním zobrazování mají významná omezení včetně efektu fotobělení (*photobleaching*), nízkých intenzit signálu a širokého fluorescenčního spektra, což může být snadno narušeno fluorescenčním signálem pozadí emitovaným maticí vzorku [157]. Poslední pokroky v nanomateriálech, jako jsou luminiscenční kvantové tečky, fluorescenční latexové částice, otevřely slibné pole směrem k vývoji luminiscenčních bioznaček. Luminiscenční kvantové tečky byly konjugovány s biomolekulami a ukázalo se, že jsou lepšími značícími činidly než běžně dostupná organická barviva. Luminiscenční kvantové tečky však mají některé nedostatky, jako je špatná rozpustnost ve vodě (pokud nejsou modifikovány), aglutinace, střední kvantové výtěžky a vysoká toxicita složek kadmia. Použití kvantových teček v biomedicínských polích je tedy omezené [160].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla příprava a optimalizace bioaktivního nosičového systému s charakteristikami jako je vysoká účinnost, stabilita a pomalé uvolňování látek pro vývoj vakcíny s modelovým proteinem pro slizniční podání s výhodami nanomateriálů. Jako nosičový systém byly zvoleny a připraveny částice z chitosanu, z chitosanu a kyseliny hyaluronové, a chitosanu s polykaprolaktonem. Na připravené nosiče byl fyzikální sorpcí anebo kovalentně navázán modelový protein ovalbumin. Hodnocení vlastností nosičového systému zahrnovalo distribuci hydrodynamické velikosti částic (DLS), ověření jejich stability měřením povrchového náboje (zeta potenciálu) a míra vazby a uvolnění proteinu v čase do různých médií jako simulace *in vivo* prostředí.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- analyzátor velikosti částic a Z-potenciálu HORIBA Scientific SZ-100-Z (HORIBA Ltd, Horiba France SAS, Francie)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Dialysis tubing cellulose (dialyzační střívka) – MWCO 3500 Da, SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Germany)
- Dialysis tubing cellulose (dialyzační střívka) – Typical MWCO 12 400 Da, average flat width, 43 mm, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- filtr pro injekční stříkačku (25 mm Syringe Filter) – 0,45 μm celulózo-acetátová membrána (VWR international, North America, USA)
- křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm (Exacta + Optech, Mnichov, Německo)
- magnetické míchadlo Big Squid (IKA-WERKE, Německo)
- magnetické míchadlo LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika)
- mini-rotátor Biosan Bio-RS-24 (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- spektrofotometr Labsystems Multiscan RC (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki Vantaa, Finsko)
- stanice pro přípravu deionizované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Spojené státy americké)
- termostat INCU-Line (VWR International Ltd, Lutterworth, Leicestershire, Velká Británie)
- třepačka Mini-Rocker MR-1 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- vortex (Grant-bio, Cambridge, Velká Británie)
- laboratorní pomůcky – laboratorní sklo (kádinky, odměrné nádoby, odměrné válce), lékovky s víčkem, mikrozkuhavky Eppendorf, mikropipety Eppendorf a Biohit, mikrotitrační destičky, Petriho misky, plastové nádoby (různé velikosti)

3.2 Reagencie a chemikálie

- Albumin from chicken egg white (ovalbumin), A7641, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)
- Deionizovaná voda
- Dodecylsulfát sodný (SDS) – $M_r = 288,37 \text{ g/mol}$, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Lachema a.s. (Neratovice, Česká republika)
- Fluorescein isothiocyanate (fluorescein isothiokyanát, FITC) – $M_r = 389,382 \text{ g/mol}$ $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$, 46424, Fisher Scientific, spol. s. r. o. (Pardubice, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p. a. – $M_r = 358,14 \text{ g/mol}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Chitosan (deacetylated chitin, Poly(D-glucosamine), $M_w \sim 50 - 190 \text{ kDa}$, 448869, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Chitosan (deacetylated chitin, Poly(D-glucosamine), Primex $> 95\%$ deacetylate, $M_w \sim 110 - 360 \text{ kDa}$, high quality 10, 43000, ChitoClear (Siglufjordur, Island)
- Chlorid vápenatý bezvodý – $M_r = 110,99 \text{ g/mol}$, CaCl_2 , Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Kyselina hyaluronová, HYSILK, 200318-E1, $M_w \sim 150 - 350 \text{ kDa}$, Contipro (Dolní Dobrouč, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. – $M_r = 60,05 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,055 \text{ g/cm}^3$, CH_3COOH , Penta s. r. o. (Chrudim, Česká republika)
- Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, 23235, Pierce Biotechnology (Waltham, MA, USA)
- *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), E6383-1G, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$, $M_r = 191,70 \text{ g/mol}$, EC 247-361-2, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS), 56485-1G, $\text{C}_4\text{H}_4\text{NNaO}_6\text{S}$, $M_r = 217,13 \text{ g/mol}$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Polycaprolactone (Poly- ϵ -kaprolakton, PCL), $M_w \sim 14\,000 \text{ Da}$, 440752, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Propan-1,2,3-triol (glycerol) – $M_r = 92,09 \text{ g/mol}$, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)

- Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát) – Mr = 156,01 g/mol; 1 M NaH₂PO₄ · 2 H₂O, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Česká republika)
- Sodium chloride (chlorid sodný) – Mr = 58,44 g/mol, NaCl, Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Česká republika)
- Sodium tripolyphosphate (tripolyfosfát sodný, TPP) – Mr = 367,86 g/mol, Na₅O₁₀P₃, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Tween 80 (C₃₂H₆₀O₁₀), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)

3.3 Příprava chitosanových částic

Principem přípravy chitosanových částic (CS-TPP) je ionotropní gelovatění chitosanu, jako polykationtu, s anionty tripolyfosfátu (TPP). Metoda je založena na smísení dvou vodných roztoků při laboratorní teplotě [161].

Použité roztoky:

- 1 M roztok kyseliny octové (CH₃COOH)
- 0,2% roztok chitosanu v 0,025 M acetátovém pufru pH 5,2 (0,07 g chitosanu rozpuštěno v 35 ml 0,025 M acetátového pufru pH 5,2)
- 0,84 mg/ml roztok TPP v deionizované vodě

Pracovní postup:

Nejprve byl připraven 0,2% roztok nízkomolekulárního chitosanu (Sigma-Aldrich, St. Louis) s molekulovou hmotností 50 – 190 kDa. Chitosan byl předem hydratován a rozpuštěn v 0,025 M acetátovém pufru pH 5,2 na magnetickém míchadle LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika) po dobu 16 hodin při laboratorní teplotě, pH roztoku bylo upraveno. Navážka tripolyfosfátu (TPP) byla rozpuštěna v deionizované vodě a roztok TPP byl následně po kapkách pipetou přikapáván k roztoku chitosanu na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Tvorba částic probíhala po dobu 30 minut. Poměr objemových dílů roztoků chitosanu k TPP byl 2 : 1. Po uplynutí této doby byla provedena dialýza připravených částic podle metody 3.7. U připravených a homogenizovaných vzorků částic byla měřena hydrodynamická velikost (DLS) a zeta potenciál v prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2.

3.4 Příprava částic z chitosanu a kyseliny hyaluronové

Principem přípravy chitosanových částic s kyselinou hyaluronovou (HA/CS-TPP) je vznik kovalentní vazby karboxylových skupin kyseliny hyaluronové s volnými aminoskupinami CS přítomnými na povrchu jeho molekul. Metoda byla upravena podle [95].

Použité roztoky:

- 0,05% roztok kyseliny octové (CH_3COOH)
- 1 M roztok kyseliny octové (CH_3COOH)
- 2,5 mg/ml roztok chitosanu v 0,05% CH_3COOH
- 0,25 mg/ml roztok chitosanu v deionizované vodě
- 0,25 mg/ml roztok TPP v deionizované vodě
- 0,1 M acetátový pufr pH 5
- 1,5 mg/ml roztok kyseliny hyaluronové v 0,1 M acetátovém pufru pH 5

3.4.1 Příprava chitosanových částic (5 : 1)

Pracovní postup:

Roztok CS o koncentraci 2,5 mg/ml v 0,05% CH_3COOH byl rozpouštěn po dobu 24 hodin na magnetickém míchadle LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika) při laboratorní teplotě. Z tohoto zásobního roztoku byl vytvořen roztok CS o koncentraci 0,25 mg/ml v deionizované vodě a následně byl přefiltrován přes 0,45 μm celulózo-acetátovou membránu filtru pro injekční stříkačku 25 mm, Syringe Filter (VWR international, North America, USA). Roztok TPP o koncentraci 0,25 mg/ml byl také přefiltrován a následně po kapkách pipetou přikapáván k roztoku CS na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Tvorba částic probíhala po dobu 30 minut. Poměr objemových dílů roztoků chitosanu k TPP byl 5 : 1. Částice byly dialyzovány do roztoku 0,1 M acetátového pufru pH 5 podle kapitoly 3.7. Dialýza probíhala 16 hodin při laboratorní teplotě na laboratorní třepače Mini-Rocker MR-1 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké).

3.4.2 Obalení chitosanových částic kyselinou hyaluronovou

Pracovní postup:

Dialyzované částice byly následně obaleny kyselinou hyaluronovou HYSILK, $M_w \sim 150 - 350$ kDa, Contipro (Dolní Dobrouč, Česká republika), a to přikapáváním CS-TPP částic k roztoku HA na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poměr objemových dílů roztoku chitosanových částic k HA byl 1 : 1. U připravených a homogenizovaných vzorků částic byla měřena DLS a zeta potenciál v prostředí deionizované vody podle kapitoly 3.8.

3.5 Příprava částic z chitosanu a polykaprolaktonu

Principem přípravy chitosanových částic s polykaprolaktonem (PCL/CS) je smíšení dvou polymerů na základě různého stupně hydrofobicity. Metodou povrchové polymerní dispozice vytvoří hydrofilní CS vazbu s hydrofobním polykaprolaktonem. Postup přípravy PCL/CS částic byl převzat a upraven podle [106] a [164].

Použité roztoky:

- 0,2 % roztok poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) v acetonu
- 0,1 % roztok chitosanu v 1 % kyselině octové
- 5% Tween 80
- glycerol
- deionizovaná voda

Pracovní postup:

Pro přípravu 0,2 % roztoku poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) o $M_w \sim 14\ 000$ Da (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké) v acetonu byl navážený PCL rozpuštěn v acetonu o analytické čistotě a zahříván na teplotu 50 °C po dobu 30 minut. V dalším kroku byl připraven 0,1% roztok nízkomolekulárního chitosanu (Primex > 95% deacetylate, $M_w \sim 110 - 360$ kDa, ChitoClear; Siglufjordur, Island) v 1% kyselině octové (Penta s.r.o., Chrudim, Česká republika) s 5% Tweenem 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké). Rozpouštění probíhalo 2 hodiny na magnetickém míchadle v digestoři při laboratorní teplotě. Následně byl roztok chitosanu s Tweenem 80 v kádince homogenizován pomocí ultrazvukového (UZ) homogenizátoru s jehlou 3 mm. Postupně byl přikapáván roztok PCL se současnou UZ homogenizací po dobu 1 minuty. Připravený roztok byl přenesen na magnetické míchadlo LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika) na 45 minut

se stupněm otáček 3. U připravených vzorků částic byly měřeny DLS a zeta potenciál podle kapitoly 3.8. Částice byly dále zakoncentrovány pomocí centrifugace při 16000 x g se 100 μ l glycerolu v plastové tubě po dobu 75 minut při teplotě 4 °C. Pasteurovou pipetou byl opatrně odebrán supernatant (na dně zůstaly částice ve zbývajícím roztoku). Poté byla provedena dialýza vzorku v 1l deionizované vody po dobu 48 hodin na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Bylo použito dialyzační střívko s mezní molekulovou hmotností 3500 Da (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) a 2x vyměněno dialyzační prostředí. U dialyzovaných a homogenizovaných částic byly měřeny DLS a zeta potenciál podle kapitoly 3.8.

3.6 Fluorescenční značení chitosanu

Principem fluorescenčního značení chitosanu je reakce mezi izothiokyanátovou skupinou FITC a primárním aminem chitosanu (CS). Metoda je upravena podle [157].

Použité roztoky:

- 0,1 M kyselina octová
- 1% chitosan v 0,1 M kyselině octové
- 25 mg FITC v 35 ml methanolu
- 0,2 M NaOH

Pracovní postup:

Z roztoku FITC (Fisher Scientific, spol. s r.o., Pardubice, Česká republika) v methanolu bylo odebráno 8,75 ml a přidáno k 6,25 ml 1% CS v kyselině octové v 50 ml tubě. Inkubace probíhala 3 hodiny v zatemnění při laboratorní teplotě a za mírného míchání. Dále byl roztok značeného chitosanu 0,2 M NaOH precipitován až do pH 10. Následně byl FITC-CS centrifugován při rcf 4500 g a teplotě 20 °C po dobu 30 minut. Peleta byla poté 3x promyta směsí methanolu-vody (70/30, v/v) s centrifugací při rcf 4500 g, a teplotě 20 °C po dobu 30 minut. Značený CS byl rozpuštěn v 15 ml 0,1 M kyselině octové a míchán na magnetickém míchadle LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika) přes noc (16 hodin). Následující den byla provedena dialýza roztoku značeného chitosanu v zatemnění v 2,5 l deionizované vody 3 dny za použití dialyzačního střívka s CO s mezní molekulovou hmotností 12 400 Da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké). Fluorescenčně značený chitosan byl pro uskladnění lyofilizován do lyofilizační vialky na -20 °C.

3.7 Dialýza připravených částic

Použité roztoky:

- 0,025 M EDTA
- 0,025 M acetátový pufr pH 5,2
- 0,1 M acetátový pufr pH 5

3.7.1 Příprava dialyzačních střívek

Pracovní postup:

Ze suchého vzorku dialyzačních střívek s obsahem glycerolu jako zvlhčovačla (pro zabránění vysychání a křehkosti) bylo odebráno 3krát po 1 metru. Pro odstranění glycerolu ze střívek byla střívka ponořena do 0,5 l deionizované vody na 3 hodiny (s výměnou vody každou hodinu). Střívka také obsahují malá množství těžkých kovů (méně než 50 ppm) a sloučenin síry (méně než 0,3%). Tyto kontaminanty byly odstraněny vařením střívek v 0,025 M EDTA a vodě po dobu 5 minut. Střívka byla skladována v destilované vodě při 4 °C.

3.7.2 Dialýza

Pracovní postup:

Připravené částice (CS-TPP; HA/CS-TPP) byly dialyzovány do prostředí 25 mM acetátového pufru pH 5,2 či 0,1 M acetátového pufru pH 5 za použití dialyzačních střívek (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany) s mezní molekulovou hmotností 3500 Da. Dialýza trvala 16 hodin při laboratorní teplotě s mírným mícháním. V průběhu této doby bylo 3krát vyměněno dialyzační prostředí s celkovým objemem odpovídajícím nejméně 100 násobku objemu vzorku v dialyzačních střívkách.

3.8 Charakterizace částic

Průměrná hydrodynamická velikost (DLS), polydisperzní index (PDI) a zeta potenciál připravených částic v různých médiích byly determinovány pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) na přístroji Horiba Scientific (software SZ-100).

3.8.1 Měření hydrodynamické velikosti částic

Použité roztoky:

- 0,025 M acetátový pufr pH 5,2 pro CS-TPP částice (2 : 1)
- deionizovaná voda pro CS-TPP částice (5 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částice

Pracovní postup:

Pro měření DLS částic bylo odebráno 250 µg připravených částic, které byly doplněny na celkový objem 1,5 ml příslušným pufrům či deionizovanou vodou. U takto připravených a homogenizovaných vzorků částic byla změřena hydrodynamická velikost na přístroji Horiba Scientific (software SZ-100). Průměrná velikost částic byla měřena pod úhlem 173° v jednorázových kyvetách (Brand GMBH, P-LAB, Praha, Česká republika). Každé měření bylo provedeno nejméně ve 12 opakováních po 30 sekundách při teplotě 25 °C. Data byla statisticky vyhodnocena a s výstupem hodnot DLS byly udány směrodatné odchylky.

3.8.2 Měření zeta potenciálu částic

Pracovní postup:

Pro měření zeta potenciálu částic bylo odebráno 250 µg připravených částic, které byly doplněny na celkový objem 1,5 ml příslušným pufrům či deionizovanou vodou. Vzorek částic byl pomocí plastové stříkačky pomalu vstříknut do měřicí kyvety, jež byla složena z elektrod a vzorkové komory. Bylo dbáno na to, aby v komoře nebyly lokalizovány žádné vzduchové bubliny, jež by mohly zásadně ovlivnit výsledky měření. Připravená kyveta s homogenizovaným vzorkem částic byla vložena do analyzátoru Horiba Scientific (software SZ-100) a byl změřen zeta potenciál. Analýza probíhala nejméně ve 12 opakováních bez prodloužení při úhlu rozptylu 90° a konstantní teplotě 25 °C pro udržení konstantní viskozity média. Výsledné hodnoty zeta potenciálu byly určeny jako průměr z těchto 12 měření podobně jako elektroforetická mobilita.

3.9 Vazba ovalbuminu na chitosanové částice karbodiimidovou metodou

Principem karbodiimidové metody vazby je aktivace karboxylové skupiny pro přímou reakci s primárními aminy prostřednictvím tvorby amidové vazby. Název této metody je odvozen od použitého činidla 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidu (EDC), který svým působením aktivuje karboxylové skupiny. Karbodiimidy jsou považovány za zesilující činidlo (tzv. *cross-linking agent*). Žádná část jejich chemické struktury se nestane součástí konečné vazby mezi konjugovanými molekulami (karboxyl-amin) [168]. Metoda je upravena podle [162].

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- 0,025 M acetátový pufr pH 5,2
- roztok 1 M kyseliny octové (CH₃COOH)
- roztok sulfo-NHS – 1,25 mg sulfo-NHS v 200 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3
- roztok EDC – 7,5 mg EDC v 200 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3
- roztok ovalbuminu (OVA) o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Pracovní postup:

CS částice byly připraveny metodou ionotropního gelovatění chitosanu s anionty TPP podle kapitoly 3.3. Následně byly 4 mg částic centrifugovány po dobu 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a částice byly promyty 1 x 1 ml deionizované vody a znovu centrifugovány s odstraněním supernatantu. Experiment byl proveden v tripletu. K částicím bylo v rychlém sledu přidáno 500 µl (0,5 mg) roztoku ovalbuminu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké), dále 200 µl roztoku EDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké) a 200 µl roztoku sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké). Reakční směs byla doplněna na celkový objem 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrem pH 7,3 a inkubována 2 hodiny při 4 °C za mírného otáčení (přibližně 20 ot/min). Po inkubaci byly částice s imobilizovaným OVA centrifugovány a promyty:

- 1 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3
- 1 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl
- 1 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3

Stanovení množství imobilizovaného proteinu na částicích bylo provedeno metodou BCA.

3.10 Adsorpce ovalbuminu na chitosanové částice

Podmínky adsorpce byly převzaty z metody karbodiimidové vazby (kapitola 3.9) bez použití aktivačního činidla. Principem adsorpce je interakce mezi ovalbuminem a částicovým nosičem z chitosanu, při které se uplatňují nízkoenergetické síly (jako jsou iontové interakce, Van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a hydrofobní interakce) a ovalbumin se sorbuje na vnější strukturu částic [168].

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- ovalbumin o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Pracovní postup:

Vzorky chitosanových částic CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS, v množství 4 mg v roztoku, byly pro odstranění a separování částic od roztoku centrifugovány 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. V dalším kroku byly částice promyty 1x 1 ml deionizované vody s odstraněním supernatantu. Poté bylo k částicím přidáno 500 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 500 μ l roztoku ovalbuminu (0,5 mg rozpuštěno ve stejném fosfátovém pufru). Reakční směs byla inkubována za mírného otáčení 2 hodiny při laboratorní teplotě. Vše bylo provedeno v tripletu. Pro stanovení koncentrace sorbovaného proteinu na částicích metodou BCA (kapitola 3.11) byly uchovány supernatanty před vazbou a po vazbě.

3.11 Stanovení koncentrace proteinu bicinchoninovou metodou

Bicinchoninová (BCA) metoda je kolorimetrická metoda využívající sodné soli bicinchoninové kyseliny ke spektrofotometrickému stanovení proteinů. Principem stanovení koncentrace proteinu na částicích bylo spektrofotometrické stanovení absorbance fialovomodrého komplexu, který vznikl redukcí Cu^{2+} iontu na Cu^+ iont peptidovou vazbou proteinu a následnou chelatací Cu^+ iontu sodnou solí bicinchoninové kyseliny. Nezbytností je před analýzou jednotlivých vzorků paralelně měřit koncentraci standardu, jehož koncentraci známe a po sestrojení kalibrační křivky stanovit koncentraci proteinu v analyzovaných vzorcích. Použitý postup byl převzat z Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit. Standardem pro kalibraci byl zvolen ovalbumin (konc. 2 mg/ml; Sigma-Aldrich), jehož koncentrační řada byla připravena podle 3.11.1.

3.11.1 Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Pracovní postup:

Kalibrační řada o koncentracích 200; 150; 100; 40; 20; 10; 5; 2,5 a 0 µg proteinu o celkovém objemu 1 ml byla připravena z OVA (zásobní roztok 2 mg/ml) dle Tabulky 4. K přípravě roztoku OVA o příslušných koncentracích byl navážen 1 mg OVA a rozpuštěn v 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3. Připravené kalibrační roztoky v mikrozkušnicích byly pipetovány po 150 µl do mikrotitrační destičky a dále k nim bylo přidáno 150 µl BCA roztoku. BCA roztok byl připraven z reagensů BCA kitu v poměru 25 dílů reagensie A : 24 dílů B : 1 díl reagensie MC. Vše bylo připraveno v tripletu a inkubováno 2 hodiny při 37 °C. Následně byla na spektrofotometru Multiscan měřena absorbance roztoků při vlnové délce 570 nm.

Tabulka 4: Příprava kalibrační řady pro metodu BCA.

Zkušavky	0,1 M fosfátový pufr [ml]	ovalbumin [µl]	Výsledná koncentrace ovalbuminu [µg/ml]
A	0,900	100	200
B	0,925	75	150
C	0,950	50	100
D	0,980	20	40
E	0,990	10	20
F	0,995	5	10
G	0,998	2,5	5
H	0,999	1,25	2,5
SLEPÝ VZOREK	1,000	0	0

3.11.2 Stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích metodou BCA

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- ovalbumin o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Pracovní postup:

Vzorky byly připraveny v tripletu. Aliquoty částic (tj. 4 mg) byly centrifugovány 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odebrán veškerý supernatant, k částicím bylo přidáno 150 μ l 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3 a roztok BCA o objemu 150 μ l. Takto připravené částice byly inkubovány na rotátoru při 37 °C po dobu 2 hodin. Supernatanty po vazbě a promývací frakce byly pipetovány po 150 μ l do mikrotitrační destičky, dále k nim bylo přidáno 150 μ l roztoku BCA a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly částice centrifugovány (5 minut, 5 000 otáček za minutu), supernatant byl přenesen do mikrotitrační destičky a všechny vzorky byly změřeny na spektrofotometru Multiscan při vlnové délce 570 nm. Jako slepý vzorek sloužil fosfátový pufr o pH 7,3 anebo samotné chitosanové částice bez ovalbuminu. Od naměřených absorbancí vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku a koncentrace proteinu byla vyhodnocena metodou kalibrační křivky. Stanovení koncentrace proteinu na chitosanových částicích bylo provedeno ve 3 opakováních a koncentrace proteinu byla přepočtena na 4 mg částic.

3.12 Hodnocení účinnosti adsorpce ovalbuminu na částice a vazebná kapacita nosiče

U všech připravených vzorků částic s ovalbuminem byla vypočítána účinnost adsorpce a vazebná kapacita nosiče podle metody popsané v [164]. Tyto parametry byly kvantifikovány stanovením koncentrace proteinu v supernatantu částic metodou BCA. Supernatant bez částic byl použit jako slepý vzorek, aby se zamezilo interferenci. Účinnost adsorpce vyjadřuje procento hmotnosti proteinu zachyceného v polymerním nosiči ve vztahu k počátečnímu množství vloženého proteinu (Rovnice 2). Kapacita nosiče udává procento hmotnosti proteinu, který je zachycen na částicích (Rovnice 3).

$$\text{Účinnost adsorpce [\%]} = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein po vazbě } [\mu\text{g/ml}]}{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

Rovnice 2: Výpočet účinnosti adsorpce v procentech.

$$\text{Vazebná kapacita nosiče [\%]} = \frac{\text{celkový vložený protein } [\mu\text{g/ml}] - \text{nenavázaný protein po vazbě } [\mu\text{g/ml}]}{\text{hmotnost částic v suchém stavu } [\mu\text{g/ml}]} \cdot 100$$

Rovnice 3: Výpočet vazebné kapacity nosiče v procentech.

3.13 *In vitro* uvolňování proteinu z částic

Studie *in vitro* uvolňování proteinu z částic byla převzata a upravena podle [88, 164].

Použité roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 5,5
- fyziologický roztok pufovaný fosfátem (PBS) pH 7,4
- zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Pracovní postup:

Z roztoku částic s adsorbovaným proteinem (0,5 mg OVA) připravených dle kapitoly 3.10, byl odebrán objem s obsahem 4 mg částic. Vzorky částic byly připraveny v tripletu a centrifugovány 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, který byl uschován pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA. Částice byly následně resuspendovány do 1 ml PBS pufru pH 7,4 či 0,1 M acetátového pufru pH 5,5

a inkubovány za mírného otáčení či třepání při 1000 rpm při 37 °C. Supernatant byl sbírán v časových intervalech – 0, 5, 10, 15, 30, 60 minutách, 3, 20 a 24 hodinách, včetně centrifugace (5 minut, 5000 otáček za minutu). Poté byly částice znovu resuspendovány do 1 ml příslušného pufru. Množství uvolněného proteinu ve frakcích, vazebném roztoku před vazbou OVA do částic a v roztoku po vazbě OVA do částic bylo stanoveno metodou BCA uvedené v kapitole 3.12. Výpočet množství uvolněného ovalbuminu byl proveden podle následující Rovnice 4:

$$\text{uvolněný ovalbumin [\%]} = \frac{\mu\text{g uvolněného ovalbuminu}}{\mu\text{g sorbovaného ovalbuminu}} \cdot 100$$

Rovnice 4: Výpočet množství uvolněného ovalbuminu v procentech.

Pro vyhodnocení uvolňování ovalbuminu z částic byla použita metoda kumulativní křivky uvedené v [161], která vyjadřuje koncentraci uvolněného proteinu v promývacích frakcích v čase. Kumulativní množství uvolněného ovalbuminu (v %) ze 4 mg částic bylo spočítáno z průměrných hodnot 3 repetitivních měření.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimenty této diplomové práce se zabývají přípravou a studiem mikročástic z přírodního polymeru chitosanu jako nosiče modelového proteinu ovalbuminu. Diplomová práce je součástí výzkumu zaměřeného na vývoj slizniční vakcíny s použitím polymerních částic. V posledních letech upoutal chitosan velkou pozornost kvůli své netoxičitě, biologické rozložitelnosti a vynikající biokompatibilitě, jakož i svým vlastnostem zvyšujícím mukoadhezivitu a propustnost pro dodávání peptidů, proteinů a DNA vakcín [4].

Příprava částic vhodných velikostí je rozvíjena směrem k monodisperzním a homogenním velikostem s rozměry přibližně 100 nm.

Výchozí metoda přípravy částic je ionotropní gelovatění, založené na iontových interakcích mezi kladně nabitými primárními aminoskupinami chitosanu a záporně nabitými skupinami polyaniontu, jako je tripolyfosfát sodný (TPP). Tento fyzikální zesíťovací proces nejenže zabrání použití chemických zesíťovacích činidel a emulgátorů, které jsou často toxické pro organismy, ale také zabrání možnosti poškození léčiv, zejména biologických činidel. Tento postup byl upraven podle [162] s poměrem chitosanu a TPP (2 : 1).

CS-TPP submikročástečky mohou vykazovat širokou distribuci velikostí částic (od 100 do 400 nm) a nižší stabilitu, což omezuje jejich použitelnost v některých aplikacích [106]. Doposud je stále výzvou připravit nanočástice CS-TPP s vysokým stupněm monodisperzity a stability optimální a účinnou metodou. A zaměřit se na reprodukovatelnou přípravu CS-TPP částic s požadovanými vlastnostmi, pro transportní systémy pro aplikaci léčiv a dodávání genů. Parametry, jako je zdrojový chiton, stupeň deacetylace, pH, koncentrace a poměr složek, nejvíce ovlivňují tvorbu částic a je nutná jejich optimalizace. Průměrná velikost částic a střední distribuce velikosti jsou základními vlastnostmi, které ovlivňují adhezi, interakci s biologickými buňkami a distribuci částic v *in vivo* systému, biologický osud a toxicitu částic a schopnost cílení částic s inkorporovanými terapeutickými léčivy.

Dalšími vhodnými polymery pro modifikaci chitosanových částic, byly použity kyselina hyaluronová (HA) a polykaprolakton (PCL). U částic byla sledována změna distribuce hydrodynamické velikosti částic a povrchového náboje jako ukazatelů jejich stability.

Důvodem použití kyseliny hyaluronové v přípravě částic je potenciální zlepšení transportu k buňkám, kdy vrstva HA na CS-NP urychluje buněčný příjem NP pomocí receptorem zprostředkované endocytózy [120]. Syntetický hydrofobní polymer PCL byl použit pro syntézu částic s chitosanem, neboť svými vlastnostmi může zvýšit imunomodulační a mukoadhezivní vlastnosti částic (což je zvláště důležité pro transportní systémy antigenu

na sliznici). Zahnutí chitosanu do PCL poskytuje částicím určitý stupeň hydrofilnosti, což zvyšuje jejich stabilitu ve vodném prostředí [105]. Přítomnost chitosanu vede ke snížení cytotoxicity PCL částic a změně jejich zeta potenciálu na pozitivní, čímž se zlepšuje jejich schopnost sorbovat na negativní povrchy sliznice [107].

V této práci byla sledována průměrná hydrodynamická velikost částic, index polydisperzity (PDI) částic, účinnost adsorpce a sorpční kapacita vysokomolekulárního modelového proteinu ovalbuminu, jakožto velmi důležité vlastnosti systému částic. Pro další charakterizaci částic jako nosičového systému pro slizniční vakcíny byla sledována míra uvolnění ovalbuminu v čase do různých médií, která simulují *in vivo* prostředí. Řízené uvolňování antigenů může vést k jejich prodloužené prezentaci APC. Dílčím cílem práce bylo připravit částice ze značeného chitosanu fluorescein izothiokyanátem (FITC-CS-TPP). U částic FITC-CS-TPP byla sledována změna v hydrodynamické velikosti po přípravě a po 14 dnech skladování. Účelem fluorescenčního značení částic bylo potenciální testování částic a sledování jejich distribuce v buňkách *in vivo* systému.

Z navržených a připravených nosičových systémů bylo žádoucí vybrat vhodný nosič, který by splňoval požadované vlastnosti.

4.1 Příprava chitosanových částic

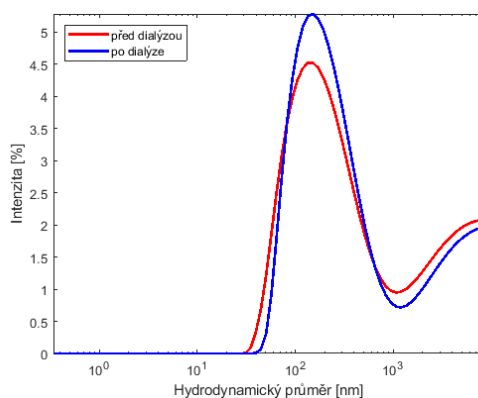
V této diplomové práci byly pro přípravu částic použity dva druhy chitosanu, jeden od dodavatele Sigma-Aldrich, St. Louis, s molekulovou hmotností 50 – 190 kDa pro CS-TPP částice a druhý nazvaný ChitoClear od výrobce Primex s vysokým stupněm deacetylace (> 95 %) pro PCL/CS částice s molekulovou hmotností 110 – 360 kDa. Pro sledování základních parametrů připravených částicových systémů byla použita metoda dynamického rozptylu světla (DLS) s rozptylovým úhlem 173° (HORIBA Scientific SZ-100, Horiba France SAS, Francie). Sledovali jsme průměrnou hydrodynamickou velikost částic; modus, tj. hodnotu, která se v daném statistickém souboru vyskytovala nejčastěji (hodnota znaku s největší relativní četností) a index polydisperzity (PDI) za účelem popisu distribuce velikosti částic. Termín „polydisperzita“ (nebo „disperzita“) se používá k popisu stupně nerovnoměrnosti distribuce velikostí částic. PDI hodnota přibližně 0,3 je považována za nejvyšší možnou mezní hodnotu pro disperzi částicových populací na bázi polysacharidů [163].

4.1.1 Částice z chitosanu a TPP (2 : 1) a (5 : 1)

Chitosanové částice byly připraveny ionotropním gelováním chitosanu (50 – 190 kDa), jako polykationtu $-\text{NH}_3^+$ s tripolyfosfátem (aniontem $-\text{PO}_4^{3-}$) nejprve v objemovém poměru 2 : 1 podle kapitoly 3.3 a následně pro zlepšení jejich vlastností v objemovém poměru 5 : 1 podle kapitoly 3.4.1. Tato technika je založena na zavedení elektrostatických interakcí mezi pozitivně nabitými aminoskupinami chitosanu (NH_3^+ , pKa acetylovaných skupin činí 6,5) a negativně nabitým tripolyfosfátem, což vede k tvorbě vhodného transportního media pro začlenění hydrofilních sloučenin [161]. U připravených částic byla měřena hydrodynamická velikost (podle metody v kapitole 3.8.1), která hraje klíčovou roli v jejich adhezi a interakci s biologickými buňkami. Částice byly měřeny před a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2 a do 0,1 M acetátového pufru pH 5. Dialýza částic měla za cíl odstranit částice s mezní molekulovou hmotností do 3500 Da. Všechna měření byla provedena nejméně v tripletu částic a byly vyhodnoceny průměrné hodnoty velikostí včetně směrodatné odchylky (SD). Data byla statisticky zpracována v programu MATLAB. Velikost připravovaných částic je dána především molekulovou velikostí chitosanu. Cílem ve vývoji částicových vakcín je jedna populace částic a úzká distribuce velikostí, tzv. monodisperze.

4.1.1.1 CS-TPP částice (2 : 1)

CS-TPP částice (2 : 1) byly po přípravě a po dialýze charakterizovány měřením hydrodynamické velikosti, výsledky jsou uvedené v Grafu 1, Tabulce 5).



Graf 1: Hydrodynamická velikost připravených CS-TPP částic (2 : 1) před dialýzou a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2.

Grafické zobrazení DLS částic před a po dialýze (Graf 1) znázorňuje polydisperzní suspenzi částic, neboť naměřená hodnota PDI (0,78) dosahuje hodnoty větší, než je mezní hodnota 0,3. To indikuje polydisperzní povahu vytvořených částic a ukazuje na případný vznik

agregátů částic. Naměřené velikosti těchto dvou populací částic byly proto hodnoceny jednotlivě.

Tabulka 5: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (2 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2 (počet opakování: 6).

	CS částice po přípravě	CS částice po dialýze
PDI	0,85 ± 0,10	0,78 ± 0,12
Pík 1 průměr [nm]	221,11 ± 40,27	236,01 ± 34,18
Pík 2 průměr [nm]	3 686,1 ± 412,85	3 923,3 ± 316,16
Pík 1 modus [nm]	136,78 ± 26,47	142,94 ± 10,61
Pík 2 modus [nm]	6 094,0 ± 895,00	6 641,1 ± 116,19

Z analýzy velikosti částic bylo zjištěno, že první populace částic (pík 1 průměr) vykazovala průměrnou hydrodynamickou velikost 221,11 ± 40,27 nm po přípravě a 236,01 ± 34,18 nm po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2. Tato velikost odpovídá označení submikro částice. Hodnoty jsou ve shodě s DLS částic 255 ± 6,27 nm uvedenou v [161], které byly připraveny stejným postupem. Druhou populací (pík 2 průměr) jsou pravděpodobně agregované shluky částic o průměrné hydrodynamické velikosti 3686,1 nm po přípravě a 3923,3 nm po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2. Nepatrné zvětšení částic po dialýze mohlo být způsobeno například fyzikální sorpcí částic či agregací menších částic. Z naměřených dat uvedených v Tabulce 5 hodnoty DLS (pík 1 a 2 průměr) příslušných populací vykazovaly velké odchylky.

Přestože systém pro doručování léčiv založený na CS-TPP částicích má své vlastní výhody, polydisperzita částic omezuje účinnost dodávání léčiv zprostředkovaných těmito částicemi. V polydisperzním systému mají větší částice obvykle vyšší kapacitu naplnění léčivem, zatímco u menších částic se očekává vyšší účinnost dodávání léčiva do tkání nebo buněk [76].

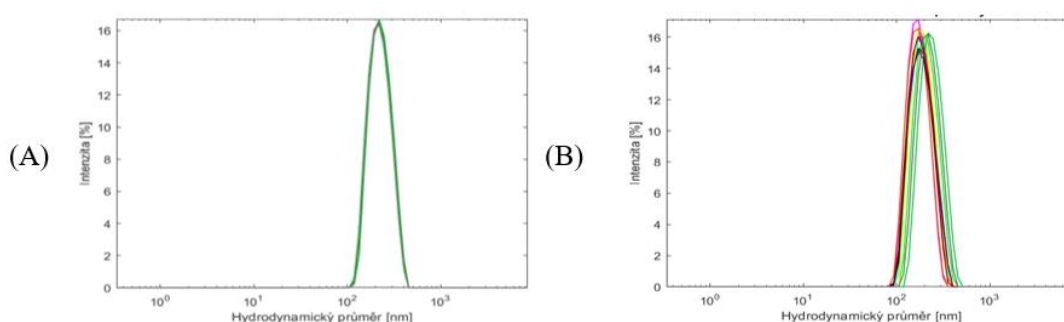
Pro odstranění tvorby agregovaných shluků částic z chitosanu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Spojené státy americké) byla dále použita metoda přípravy částic podle 3.4.1. Cílem bylo připravit částice s homogenní distribucí velikostí. Tyto požadavky byly zvoleny v souladu s účelem dalšího použití částic pro potenciální transportní systém. Na velikosti částic závisí jejich potenciální pohlcení buňkami a jejich možná cytotoxicita. Tato metoda přípravy CS-TPP částic se od předchozí metody uvedené v kapitole 3.3 liší v použití odlišného média pro rozpouštění chitosanu (0,05% kyselina octová). Druhou změnou je upravení objemových poměrů CS : TPP, 5 : 1, se snahou docílit jednotných homogenních velikostí a monodisperzní povahy částic bez vzniku agregátů.

4.1.1.2 CS-TPP částice (5 : 1)

CS-TPP částice (5 : 1) byly po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 podle kapitoly 3.4.1 charakterizovány měřením hydrodynamické velikosti popsaném v kapitole 3.8.1. (Tabulka 6, Graf 2).

Tabulka 6: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 6).

	CS-TPP částice po přípravě	CS-TPP částice po dialýze
průměrná velikost [nm]	214,91 ± 2,39	186,67 ± 18,83
PDI	0,37 ± 0,02	0,47 ± 0,08
modus [nm]	205,10 ± 0,27	173,68 ± 17,38



Graf 2: (A) Průměrná velikostní distribuce CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a (B) po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5.

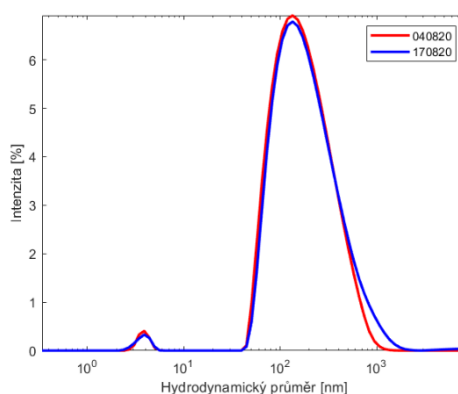
Výsledky DLS v Grafu 2 a Tabulce 6 ukazují na poměrně homogenní populaci CS-TPP částic (5 : 1). V suspenzi připravených částic nebyly pozorovány shluky a částice vykazovaly rovnoměrně rozptýlený opaleskující zákal v celém objemu. Průměrné hydrodynamické velikosti CS-TPP částic (5 : 1) dosahovaly 214,91 ± 2,39 nm po přípravě a 186,67 ± 18,83 nm po dialýze. Hodnoty velikosti a PDI částic před dialýzou (0,37 ± 0,02) a po dialýze (0,47 ± 0,08) naznačují, že došlo k mírnému zmenšení částic ale zvýšení distribuce velikosti, vlivem např. vymytí či rozpadu větších částic a k větší polydisperzitě.

4.1.1.2.1 Skladování chitosanových částic v roztoku

V tomto experimentu byl pozorován vliv skladování částic v roztoku na DLS připravených CS-TPP (5 : 1) částic a případný vznik agregátů. Vlastnosti částic by měly zůstat nezměněny po procesu přípravy a během skladování. CS částice byly připraveny, změřeny a následně skladovány při 4 °C po dobu 2 týdnů v deionizované vodě s následnou homogenizací na vortexu. Naměřené hodnoty DLS pro CS-TPP (5 : 1) částice jsou uvedeny v Tabulce 7 a znázorněny Grafem 3.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI připravených CS-TPP částic (5 : 1) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C (počet opakování: 3).

	CS-TPP částice po přípravě	CS-TPP částice po 2 týdnech skladování
PDI	0,39 ± 0,07	0,38 ± 0,04
Pík 1 průměr [nm]	3,62 ± 0,31	3,53 ± 0,47
Pík 1 modus [nm]	3,60 ± 0,32	3,55 ± 0,46
Pík 2 průměr [nm]	195,23 ± 6,67	223,86 ± 24,14
Pík 2 modus [nm]	123,99 ± 8,65	126,21 ± 0,14



Graf 3: Hydrodynamický průměr velikostí připravených CS-TPP částic (5 : 1) (červená) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C (modrá) (počet opakování: 3).

Z analýzy hydrodynamické velikosti byly zjištěny dvě populace velikostí částic. První populace částic (pík 1 průměr) vykazovala průměrné hydrodynamické velikosti $3,62 \pm 0,31$ nm po přípravě a $3,53 \pm 0,47$ nm po 2 týdnech skladování a u druhé populace (pík 2 průměr) byly naměřeny hodnoty $195,23 \pm 6,67$ a $223,86 \pm 24,14$. DLS skladovaných částic se mírně zvětšila ve srovnání s hydrodynamickou velikostí čerstvě připravených částic. Nebyly pozorovány žádné známky agregace či rozpadu částic. Homogenita suspenze vykazovala i po 2 týdnech skladování velmi dobré výsledky.

4.1.2 Stabilita částic z chitosanu a TPP (2 : 1) a (5 : 1)

Vakcína na bázi částic by měla být stabilní ve vztahu k velikosti během celého procesu přípravy, skladování a následného podávání. Důležitým parametrem, který poukazuje na stabilitu/agregaci připravených částic a adhezi částic na biologický povrch, je zeta potenciál částic. Díky tomu, že v elektrické dvojrůstvě existuje oblast iontové atmosféry, jež se s částicí pohybuje, a vrstva, která se nepohybuje, vztahuje se zeta potenciál přímo k pohyblivosti nabitě částice v elektrickém poli. Částice s potenciálem zeta kladnějším než +30 mV nebo zápornějším než -30 mV jsou považovány za stabilní [152]. Zeta potenciál jako elektrostatický potenciál je nejčastěji měřen jako elektroforetická mobilita definovaných částic v působícím elektrickém poli. Zeta potenciál je mimo jiné vysoce závislý na pH rozpouštědla použitého pro měření a na zředění suspenze, které také může vést ke změně absolutní hodnoty. Na druhou stranu může ředění zapříčinit menší variabilitu dat, proto byly roztoky měřeny vždy ve stejné koncentraci, a tím nebyl faktor ředění zahrnut do výsledků [151]. Zeta potenciál byl měřen pomocí analyzátoru HORIBA. Pro měření byly všechny vzorky dispergovány do měřicího média stejným postupem jako při měření distribuce velikosti částic. V průběhu všech měření zeta potenciálů pravděpodobně docházelo k ovlivňování výsledných hodnot vlivem sedimentace analyzovaných vzorků.

4.1.2.1 CS-TPP částice (2 : 1)

Výsledné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených CS-TPP částic po přípravě a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2 byly určeny jako průměr z minimálně 12 měřeních pro každý experiment (celkem 6x). Naměřená data byla zanesena do Tabulky 8.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených CS-TPP částic (2 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,025 M acetátového pufru pH 5,2 (počet opakování: 6).

	CS-TPP částice po přípravě	CS-TPP částice po dialýze
Zeta potenciál [mV]	28,31 ± 1,15	27,45 ± 1,11
Konduktivita [mS/cm]	1,32 ± 0,008	1,31 ± 0,007
Elektroforetická mobilita [10^{-4} cm²/Vs]	2,38 ± 0,13	2,11 ± 0,10

Připravené CS-TPP částice vykázaly pozitivní průměrnou hodnotu zeta potenciálu $28 \pm 1,1$ mV (Tabulka 9). Dialýza částic měla na změnu potenciálu jen nepatrný vliv. Výsledná hodnota zeta potenciálu je srovnatelná s hodnotami uvedenými ve studii [161], $31,6 \pm 1,4$ mV. Pozitivní náboj (dán zbytkovými aminoskupinami chitosanu po vytvoření částic), je typickou charakteristikou částic z chitosanu připravených metodou ionotropního gelování.

4.1.2.2 CS-TPP částice (5 : 1)

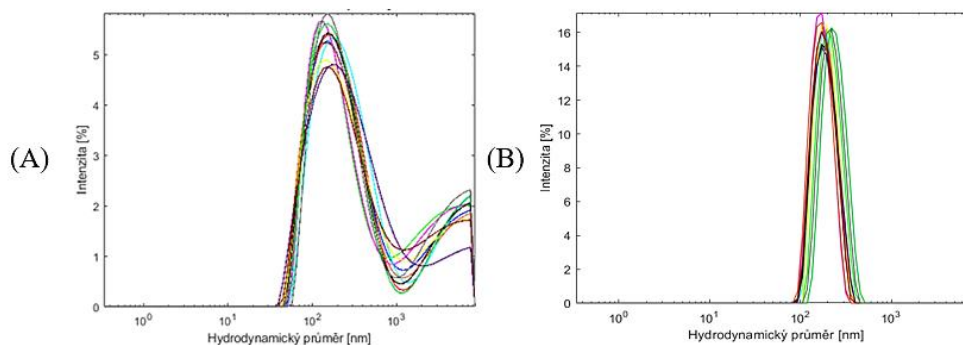
U připravených CS-TPP (5 : 1) částic měřených ve vodném prostředí vykazoval zeta potenciál pozitivní průměrnou hodnotu $27,16 \pm 4,63$ mV. Po dialýze se změnil zeta potenciál na hodnotu 2,31 mV (Tabulka 9).

Tabulka 9: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených částic CS-TPP (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 6).

	CS-TPP částice po přípravě	CS-TPP částice po dialýze
Zeta potenciál [mV]	$27,16 \pm 4,63$	$2,31 \pm 1,14$
Konduktivita [mS/cm]	$0,38 \pm 0$	$3,72 \pm 0$
Elektroforetická mobilita [10^{-4} cm²/Vs]	$1,33 \pm 0,51$	$0,18 \pm 0,09$

Dialýza v tomto případě vedla ke zvýšení nestability částic, jelikož se naměřené hodnoty téměř blíží k nule. Jelikož je zeta potenciál závislý na povrchu částic, jenž je přímo závislý na velikosti částic, mohlo dojít ke změně složení či morfologie částic, popřípadě docházelo k poměrně značné sedimentaci částic v měřicí kyvetě, a tato změna mohla snížit výsledný zeta potenciál.

V porovnání s CS-TPP (2 : 1) částicemi z kapitoly 2.3, vykazují CS-TPP částice (5 : 1) více homogenní populaci (Graf 4 A, B) s užší distribucí. Na základě těchto výsledků byly CS-TPP částice (5 : 1) shledány jako vhodnější částice pro další experimenty.



Graf 4: (A) Průměrná velikostní distribuce CS-TPP částic (2 : 1) a (B) CS-TPP částic (5 : 1).

Studie z roku 2011 [165] uvádí, že velikost vytvořených částic může záviset na pH výchozího roztoku chitosanu. V případě, že se hodnoty pH roztoku CS lišily od 4,0 do 5,5, průměrná velikost částic se zvýšila ze $148,2 \pm 8,6$ nm na $250,0 \pm 15,5$ nm, pravděpodobně v důsledku agregace vytvořených částic. Předpokládá se, že účinek pH na velikost částic CS NP je způsoben stupněm protonace CS aminové skupiny. Při pH 4,6 dochází k větší protonaci CS aminu, což umožňuje větší interakci s aniontovými ionty TPP, a to vede k menším

velikostem CS NP. Při pH 5,5 je CS méně protonovaný a v důsledku toho musí více aniontového TPP interagovat s CS polymerem, aby stabilizoval CS nanočástice, a tak vedl k větším velikostem CS nanočástic [166].

4.1.3 Částice z chitosanu a kyseliny hyaluronové

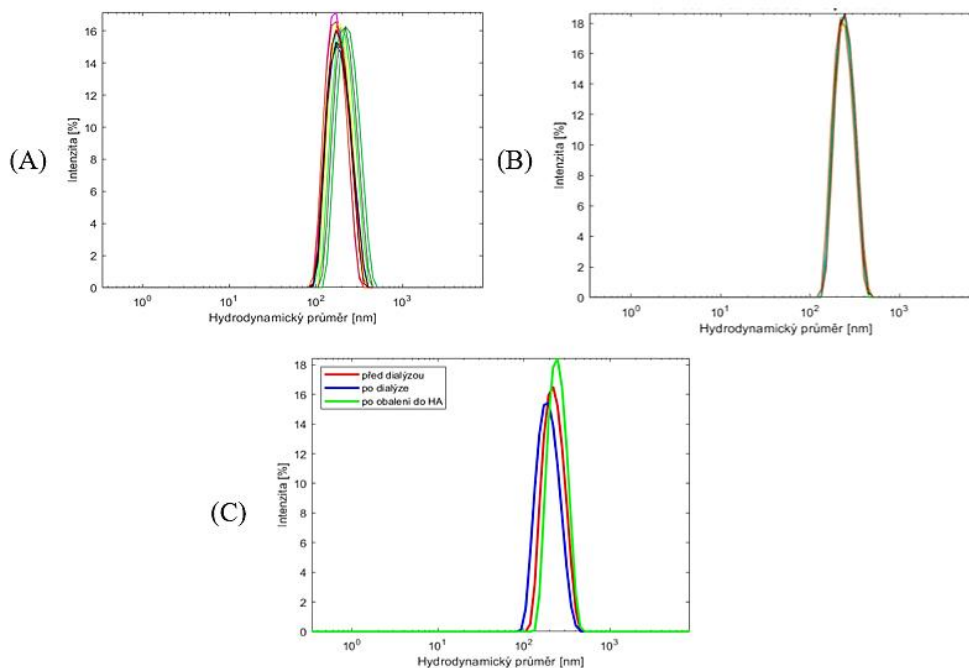
V procesu povrchového obalování částic se zpravidla používají různé druhy polyanionů (např. kyselina hyaluronová; HA) ke zvýšení podobnosti vnitřní struktury a morfologie výsledných částic. Pokud je CS hlavní složkou částic, mají tyto systémy kationtový povrch (jak je uvedeno v kapitole 1.4.2.1), který významně snižuje dobu jejich cirkulace a biologickou dostupnost při expozici biologickému prostředí. Pokud jsou však tyto částice obaleny aniontovým polysacharidem, jako je HA, sníží se rychlost adsorpce jak proteiny, tak i makrofágy. Přítomnost HA na povrchu CS částic umožňuje cílený transport k buňkám nesoucím receptory CD 44, oproti nesespecifickým mechanismům adsorpce buňkami u prostých CS částic [119].

Pro zlepšení vlastností, CS-TPP částice (5 : 1) připravené metodou 3.4.1., byly částice obaleny kyselinou hyaluronovou (HYSILK, Mw ~ 150 – 350 kDa) podle kapitoly 3.4.2. Vrstva HA na CS-NP urychluje jejich buněčný příjem pomocí receptorem zprostředkované endocytózy [120]. Takto připravené HA/CS-TPP částice byly resuspendovány v deionizované vodě a charakterizovány měřením hydrodynamické velikosti částic popsaném v kapitole 3.8.1 (Tabulka 10, Graf 5).

Tabulka 10: Průměrná hodnota hydrodynamické velikosti a PDI CS-TPP částic (5 : 1) po obalení do kyseliny hyaluronové (počet opakování: 4).

	HA/CS-TPP částice
průměrná velikost [nm]	236,84 ± 4,83
PDI	0,24 ± 0,04
modus [nm]	227,49 ± 9,44

Hydrodynamická velikost připravených HA/CS-TPP částic byla $236,84 \pm 4,83$ nm s hodnotou PDI $0,24 \pm 0,04$, která vypovídá o monodisperzitě částic a jejich velmi úzké distribuci a homogenitě velikostí.



Graf 5: (A) Průměrná velikostní distribuce CS-TPP částic (5 : 1) po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 a (B) po obalení HA v poměru 1 : 1. (C) Srovnání průměrné velikostní distribuce částic po přípravě, po dialýze a po obalení do HA.

Po obalení částic HA (aniont) se průměrná velikost významně zvýšila (ze 186,67 na 236,84 nm), což je pravděpodobně způsobeno mírnou aglomerací molekul HA během adsorpčního procesu. Studie z roku 2017 [167] rovněž uvádí zvětšení velikosti částic po jejich obalení, ze 170 nm na 270 nm.

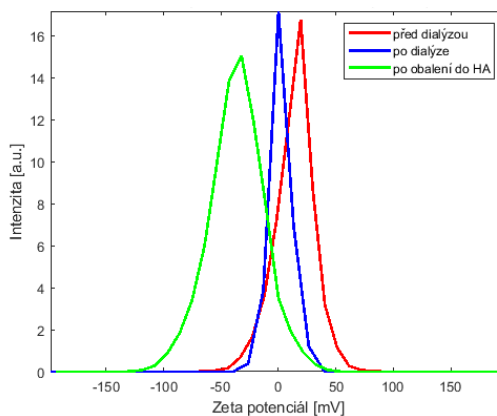
Obalením chitosanových částic kyselinou hyaluronovou (aniontu) a vzniku HA/CS-TPP částic, došlo ke změně náboje částic z kladného na záporný (Tabulka 11, Graf 6).

Tabulka 11: Průměrná hodnota zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených částic CS-TPP (5 : 1) po obalení do kyseliny hyaluronové (počet opakování: 4).

	HA/CS-TPP částice
Zeta potenciál [mV]	-36,14 ± 5,60
Konduktivita [mS/cm]	0,93 ± 0
Elektroforetická mobilita [10⁻⁴ cm²/Vs]	-2,79 ± 0,43

Po obalení částic HA byl pozitivní povrchový náboj chitosanových částic „chráněn“. Hodnota zeta potenciálu byla -36,14 ± 5,6 mV, což je podobné hodnotě -39 ± 1 mV ze studie [169], a hodnotě -32 ± 5 mV [167]. Připravené CS-TPP částice (5 : 1) po obalení do kyseliny hyaluronové lze považovat za stabilní (dosahuje hodnoty ± 30 mV).

Výsledné hodnoty hydrodynamické velikosti a zeta potenciálu HA/CS-TPP částic se také relativně shodují se studií z roku 2013 [169], kdy byly tyto částice připravovány podobným způsobem s výslednými velikostmi kolem 268 ± 43 nm s PDI $0,0 \pm 0,02$.



Graf 6: Průměrné hodnoty zeta potenciálu CS-TPP (5 : 1) po přípravě, po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 a po obalení do kyseliny hyaluronové.

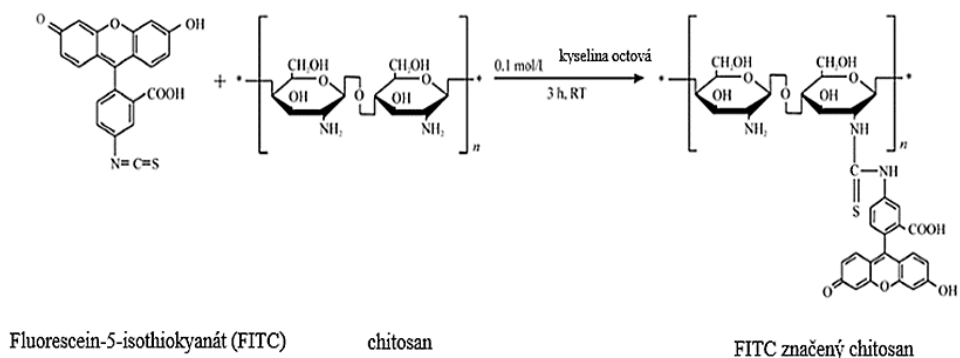
4.1.4 Fluorescenčně značené částice z chitosanu

Fluorescenční značení částic (chitosanu) umožňuje sledování jejich distribuce v buňkách (průtokovou cytometrií či fluorescenční mikroskopií). Všeobecně je vychytávání částic buňkami prezentujícími antigen *in vivo* důkazem vzniku přirozené imunitní odpovědi. Z toho důvodu jsou částice v *in vivo* systému vizualizované např. fluorescenčními barvami [157].

V rámci experiment byly provedeny dvě metody značení částic FITC. První metoda spočívala ve značení částic až po jejich vytvoření a byla založena na metodě značení molekul s aminovou skupinou (proteiny) v bazickém pH. Metoda nebyla pro účel získání homogenní suspenze částic vhodná, neboť po resuspendování v 0,1 M uhličitanovém pufru o pH 9 přestaly být částice homogenní a vykazovaly vznik agregátů. Další agregace proběhla po smíchání FITC v DMSO. Označení částic bylo ověřováno fluorescenčním mikroskopem, který značení potvrdil, avšak byly pozorovány velké agregáty. Potenciální použití suspenze pro vakcínu nelze považovat za vhodné. Druhá metoda fluorescenčního značení částic bylo značení chitosanu s následnou tvorbou částic (podle kapitoly 3.6). První vzorek chitosan-FITC byl lyofilizován (a po rozmražení použit pro další experimenty). Druhý vzorek chitosanu-FITC byl skladován při teplotě 4 °C (nebyl lyofilizován).

S ohledem na dosažené výsledky a další použití částic pro budoucí testování *in vivo*, byly v tomto experimentu připraveny CS-TPP částice (5 : 1) značené FITC (podle kapitoly 3.4.1).

U FITC/CS-TPP byla změřena hydrodynamická velikost a zeta potenciál. Způsob přípravy využíval přímého začlenění fluoresceinu do struktury částic během jejich syntézy, formou fluorescenční značení chitosanu. Reakce byla založena na vzniku kovalentní vazby reakcí mezi isothiokyanátovou skupinou FITC (Ex/Em – 490/525) a primární aminogrupou chitosanu (viz Obrázek 12). Kovalentní vazba má oproti zapouzdřenému fluoroforu jednu výhodu: barvivo se v buněčných experimentech od částice neuvolňuje, což umožňuje spolehlivé závěry [159].

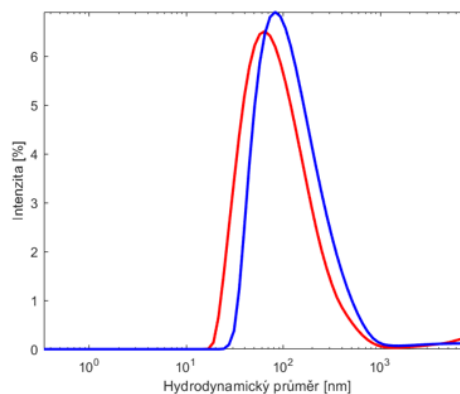


Obrázek 12: Reakční mechanismus mezi FITC a chitosanem. Převzato a upraveno z: [160].

Výsledné hodnoty průměrné hydrodynamické velikosti FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 jsou uvedeny v Tabulce 12 a znázorněny Grafem 7.

Tabulka 12: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI FITC-CS-TPP (5 : 1) částic po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 3).

	FITC-CS-TPP částice po přípravě	FITC-CS-TPP částice po dialýze
průměrná velikost [nm]	140,25 ± 8,90	150,04 ± 13,21
PDI	0,33 ± 0,01	0,28 ± 0,03
modus [nm]	106,67 ± 10,69	92,75 ± 13,91



Graf 7: Hydrodynamický průměr velikostí FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě (červená) a po dialýze (modrá) do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 3)

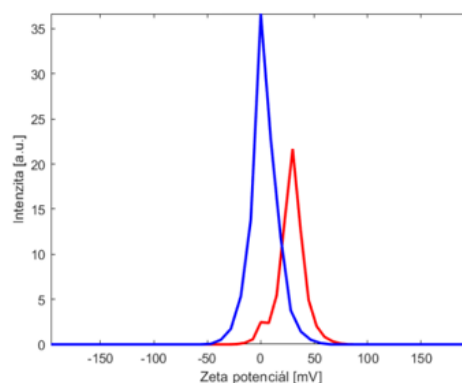
Vytvořené částice se po dialýze zvětšily, a to z $140,25 \pm 8,90$ nm na $150,04 \pm 13,21$ nm. Pravděpodobně došlo k agregaci menších částic či k nespecifické sorpci. Hodnoty PDI FITC-CS-TPP částic byly před dialýzou $0,33 \pm 0,1$ a po dialýze $0,28 \pm 0,03$. Částice vykazovaly monodisperzní velikosti s celkovou homogenní distribucí částic bez vzniklých shluků či patrných agregátů. Studie [112], ve které se tvořily částice podobným způsobem, uvádí velikost FITC-CS-TPP částic 152 nm s hodnotou PDI 0,034.

Vytvořené CS-TPP (5 : 1) částice z kapitoly 2.1.1, tedy částice bez značeného chitosanu, měly po dialýze průměrnou hydrodynamickou velikost větší, a to $186,67 \pm 18,83$ nm. Při lyofilizaci mohlo dojít ke změně struktury chitosanu (např. ledovými krystaly během fáze mrazení) či ke změně stability chitosanových molekul, a tak lyofilizovaný značený chitosan mohl mít odlišné povrchové vlastnosti při tvorbě částic než čerstvě připravený. Oboje, jak značené, tak i neznačené částice se podařilo připravit s homogenní distribucí a bez známek agregátů.

Naměřené hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených FITC-CS-TPP částic (5 : 1) jsou uvedeny v Tabulce 13 a znázorněny v Grafu 8. Snížená hodnota zeta potenciálu částic ukazuje na snížení koloidální stability, ke které pravděpodobně mohlo dojít nespecifickou sorpcí částic a změnou jejich struktury.

Tabulka 13: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě a po dialýze do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 3).

	FITC-CS-TPP částice po přípravě	FITC-CS-TPP částice po dialýze
Zeta potenciál [mV]	$25,35 \pm 4,20$	$6,04 \pm 3,06$
Konduktivita [mS/cm]	$0,32 \pm 0$	$3,24 \pm 0$
Elektroforetická mobilita [10^{-4} cm²/Vs]	$1,45 \pm 0,31$	$0,46 \pm 0,23$



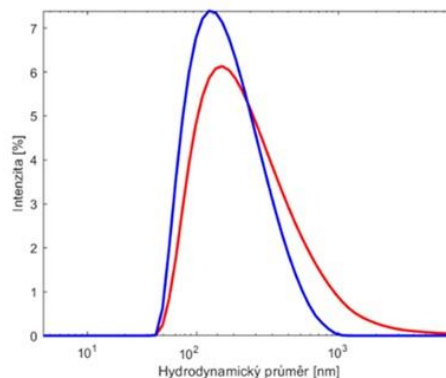
Graf 8: Průměrné hodnoty zeta potenciálu FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě (červená) a po dialýze (modrá) do prostředí 0,1 M acetátového pufru pH 5 (počet opakování: 3).

Vliv skladování na velikost FITC-CS-TPP částic (5 : 1)

Naměřené hodnoty DLS pro FITC-CS-TPP částice (5 : 1) jsou uvedeny v Tabulce 14 a znázorněny Grafem 9. Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti skladovaných částic se snížily ve srovnání s velikostí čerstvě připravených značených částic, a to z $150,04 \pm 13,21$ nm na $159,25 \pm 18,46$ nm. FITC-CS-TPP částice skladované při 4 °C vykazovaly i po 2 týdnech stabilní hydrodynamickou velikost, nedocházelo tedy k agregaci částic.

Tabulka 14: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI FITC-CS-TPP částic (5 : 1) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C (počet opakování: 2).

	FITC-CS-TPP po přípravě	FITC-CS-TPP po 2 týdnech skladování
průměrná velikost [nm]	$150,04 \pm 13,21$	$159,25 \pm 18,46$
PDI	$0,28 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,03$
modus [nm]	$92,75 \pm 13,91$	$93,28 \pm 7,35$



Graf 9: Průměrná velikostní distribuce FITC-CS-TPP částic (5 : 1) po přípravě (modrá) a po 2 týdnech uskladnění při 4 °C (červená) (počet opakování: 2).

Výsledky ukázaly, že FITC-CS-TPP částice byly za testovaných podmínek (po dobu 2 týdnů) stabilní, bez patrné změny velikostí.

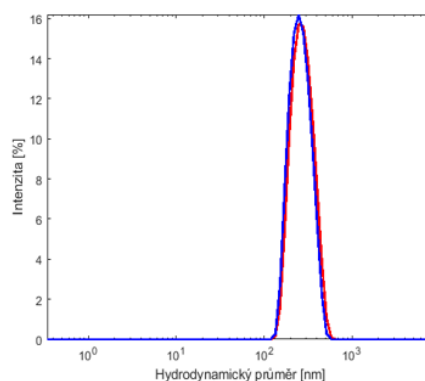
V případě, že připravené částice budou součástí vakcíny (např. jako adjuvans pro nazální vakcinaci), by mohla nestabilita během skladování vakcíny vést k fyzikálně-chemickým změnám substance a k degradaci antigenu [170].

4.1.5 Příprava částic z chitosanu a polykaprolaktonu

Částice z polykaprolaktonu a chitosanu (PCL/CS) byly připraveny podle kapitoly 3.5. Pro přípravu těchto částic byl použit chitosan ChitoClear (Primex, $M_w \sim 110 - 360$ kDa). Takto připravené PCL/CS částice byly resuspendovány v deionizované vodě a charakterizovány měřením DLS popsané v kapitole 3.8.1. Naměřená hydrodynamická velikost částic dosahovala hodnot $249,85 \pm 12,05$ nm (Tabulka 15), následná dialýza do roztoku deionizované vody DLS téměř nezměnila. Studie [164], ve které se tvořily částice podobným způsobem, uvádí velikost částic $199,5 \pm 62,0$ nm a studie [171] $208,1 \pm 28,7$ nm. Také byla sledována distribuce velikostí těchto částic, jež byly měřeny monodisperzně, avšak PDI byl vyšší než 0,3, a to $0,59 \pm 0,07$, což svědčí o polydisperzitě částic. Výsledky v Grafu 10 ukazují na homogenní suspenzi částic bez známek agregace.

Tabulka 15: Průměrné hodnoty hydrodynamické velikosti a PDI PCL/CS částic po přípravě a po dialýze do prostředí deionizované vody (počet opakování: 3).

	PCL/CS částice po přípravě	PCL/CS částice po dialýze
průměrná velikost [nm]	$264,13 \pm 13,90$	$249,85 \pm 12,05$
PDI	$0,82 \pm 0,13$	$0,59 \pm 0,07$
modus [nm]	$242,69 \pm 14,49$	$234,88 \pm 14,23$

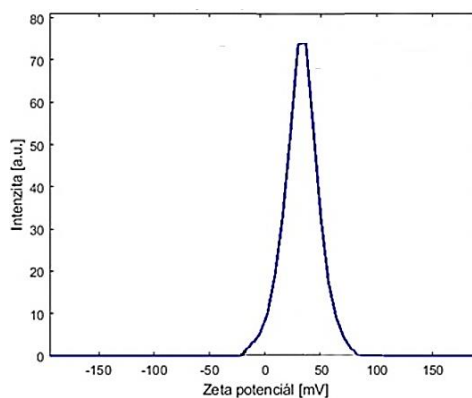


Graf 10: Průměrná velikostní distribuce PCL/CS částic po přípravě (červená) a po dialýze do deionizované vody (modrá).

Průměrné hodnoty zeta potenciálu PCL/CS částic (Tabulka 16, Graf 11) po dialýze do deionizované vody dosahovaly hodnot $+37 \pm 2,4$ mV, což vypovídá o dobré stabilitě částic. Studie [173] uvádí zeta potenciál částic jen z PCL $-1,4 \pm 4,6$ mV, zatímco chitosanové částice měly hodnoty $+26,0 \pm 0,4$ mV. Zeta potenciál PCL/CS částic tedy naznačuje, že je chitosan lokalizován současně s PCL na povrchu částic.

Tabulka 16: Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility připravených PCL/CS částic (počet opakování: 3).

	PCL/CS částice
Zeta potenciál [mV]	$37,84 \pm 2,36$
Konduktivita [mS/cm]	$0,20 \pm 0$
Elektroforetická mobilita [10^{-4} cm²/Vs]	$2,92 \pm 0,18$



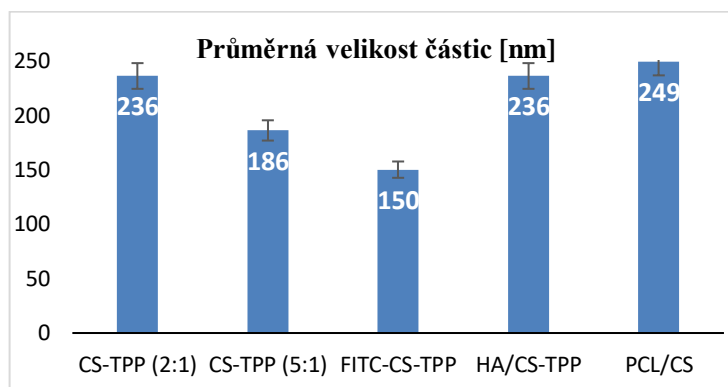
Graf 11: Průměrné hodnoty zeta potenciálu PCL/CS částic (počet opakování: 3).

4.2 Souhrn připravených částic na bázi chitosanu

Vlastnosti připravených částic z chitosanu, z chitosanu a kyseliny hyaluronové anebo s polykaprolaktonem jsou shrnuty v Tabulce 17 a Grafu 12.

Tabulka 17: Souhrnná tabulka průměrných hydrodynamických velikostí, polydisperzního indexu a zeta potenciálu připravených částic CS-TPP (2 : 1), CS-TPP (5 : 1), FITC-CS-TPP, HA/CS-TPP a PCL/CS. Výsledky jsou prezentovány se směrodatnými odchylkami a jsou nejméně ze 3 nezávislých měření.

Částice	Průměrná velikost [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]
CS-TPP (2 : 1)	236 ± 34,18 3 923 ± 316,16	0,78 ± 0,12	+27 ± 1,1
CS-TPP (5 : 1)	186 ± 18,83	0,47 ± 0,08	+2,3 ± 1,1
FITC-CS-TPP	150 ± 13,21	0,28 ± 0,03	+ 6 ± 3,1
HA/CS-TPP	236 ± 4,83	0,24 ± 0,04	-36 ± 5,6
PCL/CS	249 ± 12,05	0,59 ± 0,07	+37 ± 2,4



Graf 12: Souhrnný graf průměrných hydrodynamických velikostí připravených částic CS-TPP (2 : 1), CS-TPP (5 : 1), FITC-CS-TPP, HA/CS-TPP a PCL/CS. Polydisperzní hodnota u CS-TPP (2 : 1) částic nebyla v tomto grafu pro přehlednost zaznamenána.

CS-TPP částice (2:1) připravené metodou popsanou v kapitole 3.3 vykazovaly podstatně větší velikosti a širší distribuci velikostí než CS-TPP (5:1) připravené metodou v kapitole 3.4. CS-TPP (5:1) částice navíc netvořily agregáty. Po obalení HA se nepatrně zvětšily a v porovnání s CS-TPP částicemi vytvořily homogennější velikosti. Toto nepatrné zvětšení chitosanových částic po obalení HA je pravděpodobně důsledkem vyšší pórovitosti částic, což by umožnilo polyaniontům lépe difundovat do jejich objemu, dále je zesíťovat a tím je zmenšit. Připravené částice byly purifikovány dialýzou, avšak veškeré volné polyanionty nemusely být odstraněny.

Výsledné hodnoty velikostí částic jsou ovlivněny také rychlostí míchání základních látek. Výsledky studie [174] naznačují, že rychlost míchání během reakce ionotropního gelování je rozhodující pro velikost získaných částic. Dále tedy vyplývá, že rychlost míchání

během ionotropního gelovatění významně ovlivňuje výtěžek reakce, a proto manipulací tohoto parametru lze získat větší podíl částic daného rozsahu velikostí. Naproti tomu hodnoty zeta potenciálu nevykazovaly žádné významné rozdíly pro žádný ze studovaných faktorů (tj. reakční doba ionotropního gelovatění, rychlost míchání během reakce a doba uplynulá pro přidání roztoku tripolyfosfátu). Tato studie poukázala na to, že je do jisté míry možné kontrolovat velikost vznikajících částic jednoduše modulací rychlosti míchání během reakce. V těchto experimentech však nebyl parametr rychlosti míchání významně či cíleně sledován. Změnou povrchového náboje je možné usměrňovat distribuci částic v organismu. Pozitivní náboj povrchu částic je rozhodující pro interakci se záporně nabitým povrchem sliznice, což zvyšuje dobu setrvání transportního systému v absorpčním místě. Zeta potenciál závisí na iontové síle, pH a typu iontů v médiu, ve kterém jsou částice suspendovány. Je známo, že NP se zeta potenciálem nad +30 mV nebo pod -30 mV jsou stabilní v případě, že jsou stabilizovány pouze nábojem a nikoli (dodatečně) sterickou konfigurací. Hodnoty potenciálu zeta ± 30 mV tedy naznačují, že koloidní systémy jsou stabilní v čase, a že aminové skupiny chitosanu jsou na povrchu. Částice jsou méně náchylné k aglomeračním a destabilizačním silám, jako jsou van der Waalovy síly, Brownův pohyb nebo interakce částice-částice [164].

Z připravených částic nejsou ani jedny vhodné pro další experimenty, neboť byla vyžadována vysoká stabilita, vysoká účinnost a významná monodisperzita nosičového systému, která nebyla u částic dostačující pro potenciální *in vivo* studie.

4.3 Vazba modelového proteinu na chitosanové částice

V dalších experimentech byla studována účinnost vazby vysokomolekulárního ovalbuminu (OVA) na částice, jakožto modelového proteinu, k potvrzení schopnosti adsorpce proteinů na povrch částic. Izoelektrický bod (pI) OVA je 4,5 – 4,9 a M_w činí 42,881 Da. Hodnota izoelektrického bodu pI OVA může pomoci porozumět pozorovaným výsledkům. Pro připravené částice z chitosanu byly zvoleny dva typy vazeb ovalbuminu, adsorpce a kovalentní karbodiimidová metoda.

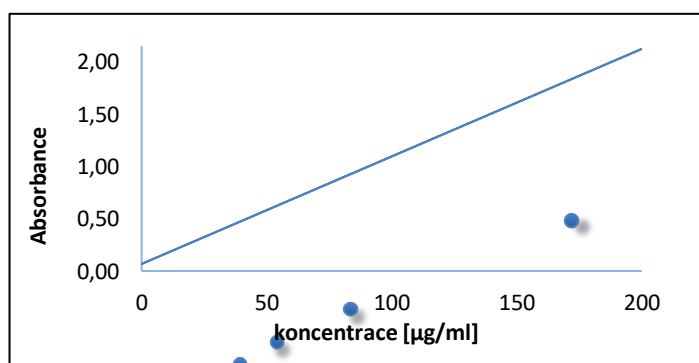
Adsorpce proteinů na povrchu materiálu je obecně považována za primární událost, ke které dochází při kontaktu materiálu s biologickým prostředím. Cílem bylo vybrat nejvhodnější částice s nejvyšší mírou adsorpce modelového proteinu.

Ovalbumin byl sorbován na vnější strukturu materiálu, také do povrchových vrstev a pórů částic. OVA však vykazuje vyšší adsorpční účinnost na povrchu částic,

neboť může být spojen elektrostatickými interakcemi mezi pozitivně nabitými aminoskupinami chitosanu a negativně nabitými karboxylovými skupinami proteinu. Uplatňují se zde také hydrofobní interakce. Tento přístup nejen pomáhá zachovat strukturu antigenu, ale také umožňuje opakované předkládání antigenu APC *in vivo*, který napodobuje mechanismus patogenů [175]. Na druhou stranu, při pH 5,7 bývají částice kladně nabitě, což by vysvětlovalo poměrně nízké % LE pozorované u tohoto proteinu. I když je izoelektrický bod užitečný pro predikci vazby proteinů na povrch částic, adsorpce je složitý proces v závislosti na několika dalších faktorech [157].

Imobilizace (0,5 mg) ovalbuminu na 4 mg částic metodou sorpce byla provedena podle kapitoly 3.10. Adsorpce probíhala po dobu 2 hodin za mírného otáčení a laboratorní teploty. Tato mírná technika zahrnuje inkubaci částic s vodným roztokem proteinu (simulovaného antigenu) za uplatnění nízkoenergetických sil. V tomto experimentu byly připraveny částice CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částice. Poté byl metodou adsorpce imobilizován ovalbumin a sledována míra účinnosti adsorpce ovalbuminu na tyto částice. Koncentrace ovalbuminu v připravených částicích byla stanovena metodou BCA podle kapitoly 3.11.2. Principem je spektrofotometrické stanovení absorbance fialovomodrého komplexu, který vznikl redukcí Cu^{2+} iontu na Cu^+ iont peptidovou vazbou ovalbuminu a následnou chelatací Cu^+ iontu sodnou solí bicinchoninové kyseliny. Použitý postup byl převzat z Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit. Pro stanovení přesné koncentrace ovalbuminu byla připravena kalibrační závislost absorbance barevného produktu na koncentraci ovalbuminu (kapitola 3.11.1) (Graf 13).

Rovnice regrese byla $y = 0,0103x + 0,0676$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9962$. Slepým vzorkem pro částice s navázaným proteinem byly částice bez proteinu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3.



Graf 13: Kalibrační závislost koncentrace ovalbuminu metodou BCA při vlnové délce 570 nm (počet opakování: 3).

Mezi mnoha dostupnými metodami je BCA metoda vhodnou volbou pro experimenty, neboť nedetekuje volné aminoskupiny, ale spoléhá se na redukční kapacitu proteinu vedoucí ke změně barvy ze zelené na fialovou. Test závislý na volných aminoskupinách může poskytnout falešně pozitivní výsledky, protože chitosan vykazuje volné aminoskupiny, které by vedly k falešnému ovlivnění výsledku.

Vazbu proteinu na částice lze popsat např. stanovením účinností adsorpce a adsorpční kapacitou. Účinnost adsorpce vyjadřuje procento hmotnosti proteinu zachyceného v polymerním nosiči ve vztahu k počátečnímu množství vloženého proteinu (Rovnice 2 v kapitole 3.12). Kapacita nosiče udává procento hmotnosti proteinu, který je zachycen na částicích (Rovnice 3 v kapitole 3.12). Zatímco účinnost adsorpce spíše poskytuje informace o účinnosti procesu, sorpční kapacita poskytuje informace o získaném nosičovém produktu. Tyto parametry byly zjištěny stanovením koncentrace proteinu v supernatantu částic (nepřímé hodnocení) metodou BCA při vlnové délce 570 nm.

Výsledné hodnoty koncentrace ovalbuminu v připravených částicích a sorpční kapacita nosiče jsou uvedeny v Tabulce 18. Z nepřímého hodnocení absorbance supernatantu a z následného vypočítání účinnosti adsorpce vyplývá, že se na částice metodou adsorpce navázalo 30,99 – 44,38 % z celkového množství adsorbovaného proteinu (tj. přibližně 0,5 mg).

Tabulka 18: Stanovení koncentrace ovalbuminu na CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částicích reprodukováno účinností sorpce nepřímou detekcí metodou BCA a výpočet sorpční kapacity nosiče vztahené na 4 mg částic (počet opakování 3).

Částice	Nepřímé hodnocení – účinnost adsorpce [%]	Adsorpční kapacita nosiče [%]
CS-TPP	42,15 ± 1,30	51,30 ± 2,29
HA/CS-TPP	44,38 ± 1,67	50,95 ± 1,58
PCL/CS	30,99 ± 1,16	35,65 ± 1,70

Z výsledků adsorpčního experimentu lze usuzovat, že míra účinnosti vazby ovalbuminu na částice metodou sorpce vykazovala podobné hodnoty u CS-TPP (tj. 42,15 ± 1,30 %) a HA/CS-TPP částic (tj. 44,38 ± 1,67 %). V porovnání s nimi, vázaly PCL/CS částice protein v menší míře, a to okolo 31 %. Zahnutí hydrofilního a pozitivně nabitého polymeru, chitosanu, do částic s hydrofobním PCL, modifikuje povrchové vlastnosti těchto částic a tím i míru adsorpce proteinů. Rozdíl v sorpci ovalbuminu může být také dán odlišným pH použitých roztoků či případnou interferencí u PCL/CS částic při metodě BCA.

Adsorpci ovalbuminu na CS-TPP částice se z části zabývala i diplomová práce Petry Behančínové [176], která uvedla, že nepřímým hodnocením účinnosti sorpce se adsorbovalo přibližně 23,7 % z celkového množství vloženého proteinu. Experiment probíhal za odlišných podmínek (velikost částic, teplota) a výsledky obou experimentů se poměrně liší. Odlišná účinnost sorpce může být vysvětlena například, odlišným pH roztoků, přesnou koncentrací ovalbuminu, jinou velikostí či stabilitou částic nebo různými vnějšími vlivy, kterými může být metoda sorpce ovlivněna.

Pro vazbu ovalbuminu na CS-TPP (2 : 1) částice byla zvolena kovalentní vazba na částice. Imobilizace ovalbuminu karbodiimidovou metodou na CS-TPP (2 : 1) částice byla provedena podle kapitoly 3.9. Principem karbodiimidové metody bylo vytvoření amidové vazby mezi aminovou skupinou ovalbuminu a hydroxylovou skupinou chitosanu. Jedná se o silnou ireverzibilní kovalentní vazbu.

Na 4 mg CS/TPP (2 : 1) částic bylo imobilizováno 0,5 mg ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3 po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Detekce míry vazby ovalbuminu spočívala v přímé detekci ovalbuminu navázaného na částicích pomocí BCA metody při 570 nm podle kapitoly 3.11.

V Tabulce 19 jsou uvedeny vypočítané hodnoty koncentrace ovalbuminu na částicích pomocí metody kalibrační křivky. Jako slepý vzorek pro částice s navázaným ovalbuminem byly zvoleny částice bez proteinu.

Tabulka 19: Stanovení koncentrace ovalbuminu a účinnosti vazby kovalentně vázaného na CS-TPP (2 : 1) částicích metodou BCA (počet opakování: 3).

Přímá detekce [$\mu\text{g}/4 \text{ mg}$]	Účinnost vazby [%]
68,24 \pm 4,04	13,65

Karbodiimidovou metodou bylo na 4 mg CS-TPP (2 : 1) částic navázáno 13,65 % z celkového vloženého ovalbuminu. Výsledné nízké hodnoty koncentrací ovalbuminu na částicích jsou ovlivněny vazbou a sorpcí ovalbuminu a následnými promývacími kroky. Faktorem může být opět vazba proteinu do vnitřní struktury částic, která je pro metodu BCA méně přístupná. Z důvodu nízké vazebné účinnosti této metody ve srovnání se sorpcí už nebyla pro další experimenty vazby proteinu na chitosanové částice využita. Metoda adsorpce je pro nosiče na bázi chitosanu vhodnějším způsobem.

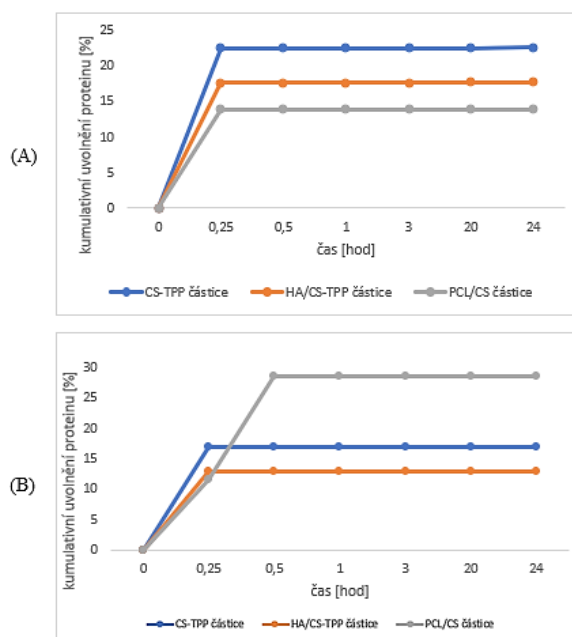
4.4 *In vitro* uvolňování ovalbuminu z částic

U připravených nosičových systémů se sorbovaným ovalbuminem jsme dále provedli studii uvolňování *in vitro*. V praxi se využívá pro sledování rychlosti uvolňování léčiv z polymerní matrice CS částic při různých podmínkách, teplotách a pH.

Studie *in vitro* uvolňování proteinu byla prováděna v PBS pufru pH 7,4 (fyziologické pH) a v 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5 (kyselejší pH). Na částice CS-TPP, HA/CS-TPP, PCL/CS bylo sorpcí navázáno 0,5 mg ovalbuminu podle kapitoly 3.10. Podmínky uvolnění ovalbuminu při fyziologické teplotě 37 °C za mírného otáčení či třepání při 1000 rpm v určitých časových intervalech jsou uvedené v kapitole 3.13. Teplota je důležitým určujícím činitelem pro integritu chitosanových částic umístěných v různých pH pufrech.

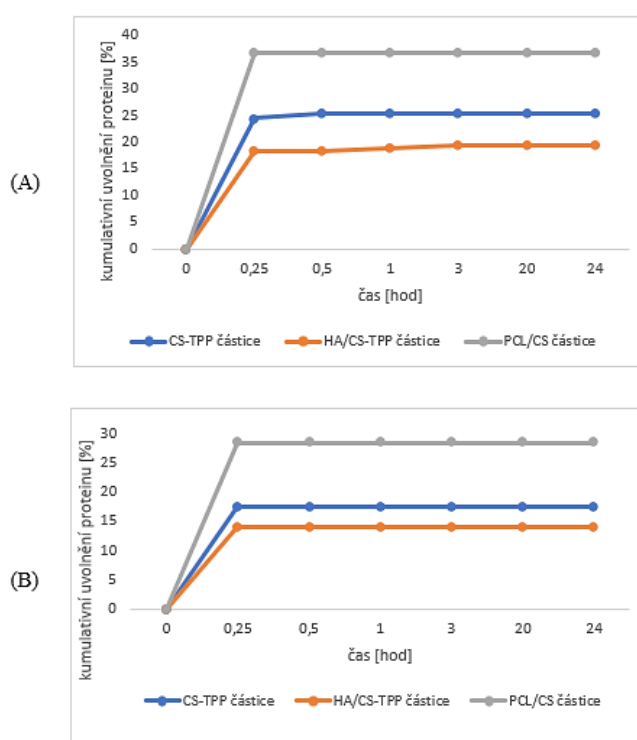
U alikvotu částic bylo na začátku experimentu stanoveno množství ovalbuminu sorbovaného na částice a do nich, a to pomocí nepřímého hodnocení účinnosti sorpce na částice, které sloužilo jako 100 % proteinu. Uvolněný protein ovalbumin v supernatantech byl kvantifikován metodou BCA. Experiment byl proveden v tripletu.

Uvolňování ovalbuminu z částic bylo vyhodnoceno metodou kumulativní křivky podle Hou, Y. et al [177], která vyjadřuje procentuální koncentraci uvolněného proteinu v promývacích frakcích v závislosti na čase. Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z částic CS/TPP (2 : 1), HA/CS-TPPP a PCL/CS je znázorněna v následujících Grafech 14 – 15.



Graf 14: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částic v promývacích frakcích v prostředí (A) PBS pH 7,4 a (B) 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5 (vztaženo na 4 mg částic; počet opakování: 3) při teplotě 37 °C.

Z vyhodnocených výsledků znázorněných kumulativní křivkou uvolňování (přibližně 0,5 mg ovalbuminu z částic) lze usoudit, že se z částic uvolnilo pouze malé množství proteinu. K uvolnění došlo v prvních 15 minutách u CS-TPP (2 : 1) a HA/CS-TPP částic. K pozvolnějšímu uvolnění ovalbuminu (kolem 30 %) došlo u PCL/CS částic v 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5, kdy se ovalbumin uvolňoval postupně po dobu přibližně 30 minut. Dále k uvolňování proteinu nedocházelo, bez ohledu na zvolené pH roztoků a jejich složení. Z tohoto důvodu bylo míchání v dalších experimentech nahrazeno třepáním při 1000 rpm. K výraznějším změnám uvolnění (Graf 15) však ani za těchto podmínek u CS-TPP (2 : 1) a HA/CS-TPP částic nedošlo. Z PCL/CS částic se uvolnilo o něco více proteinu (přes 35 %) v prostředí PBS pH 7,4.



Graf 15: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS-TPP (2 : 1), HA/CS-TPP a PCL/CS částic v promývacích frakcích v prostředí (A) PBS pH 7,4 a (B) 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5 (vztaheno na 4 mg částic; počet opakování: 3) při teplotě 37 °C.

Uvolňování proteinu z částic je ovlivněno jak vlastnostmi materiálu, tj. strukturálními, fyzikálními a chemickými vlastnosti, tak vlastnostmi vázaného proteinu (zejména jeho pI), způsobem vazby proteinu k částicím, a i reakčními podmínkami jako např. iontovou silou, pH či teplotou [177]. Testy uvolňování *in vitro* se běžně používají pro simulaci chování nanočástic v *in vivo* systémech, a tudíž se obvykle provádějí při fyziologické teplotě (tj. 37 °C) [178].

Ze získaných výsledků sledování uvolňování ovalbuminu (na částice sorbováno 0,5 mg) *in vitro* lze usoudit, že se z částic uvolnilo malé množství proteinu pouze v prvních 15 minutách a dál k uvolňování proteinu nedocházelo, bez ohledu na zvolené pH roztoků a jejich složení. Hustota zesítnění může ovlivnit asociaci a uvolňování proteinů z iontově zesítněných částic chitosanu. S ohledem na velkou molekulovou hmotnost ovalbuminu (42,7 kDa) lze předpokládat nízkou kinetiku uvolnění za takto nastavených mírných podmínek. Protein se pravděpodobně sorboval i do vnitřní struktury částic, a tak se uvolnilo pouze malé množství ovalbuminu na povrchu částic a zbylé množství zůstalo zapouzdřeno ve vnitřní struktuře částic. K jeho uvolnění by mohlo dojít například degradací chitosanových částic enzymatickými procesy [167] či upravením podmínek uvolňování, jako je větší intenzita třepání či použití jiných pufrovacích roztoků.

Dlouhodobé studie uvolňování ovalbuminu by mohly představovat vyšší kumulativní uvolňování proteinu. Časový interval testu byl nicméně naplánován v souladu s předvídatelnými maximálními retenčními časy pro orální a nosní podání vakcín. Během této doby uvolňování, za situace *in vivo*, by proteiny naplněné částice byly internalizovány buňkami, a proto by se protein uvolňoval prostřednictvím mechanismů buněčné degradace.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly připraveny chitosanové submikročástice metodou ionotropního gelovatění s cílem připravit bioaktivní nosič s definovanými charakteristikami jako je vysoká účinnost, stabilita a pomalé uvolňování látky. Hodnocení vlastností nosičového systému zahrnovalo distribuci hydrodynamické velikosti částic či ověření stability měřením zeta potenciálu. Nosičovým systémem byly částice z chitosanu, z chitosanu s obalem z kyseliny hyaluronové a z chitosanu a polykaprolaktonu.

Neprve byly připraveny částice CS-TPP (2 : 1), které byly stabilní (s pozitivní hodnotou zeta potenciálu $28 \pm 1,1$ mV), nicméně u nich byly naměřeny dvě populace velikostí ($236,01 \pm 34,18$ a $3\ 923,3 \pm 316,16$). Hodnota PDI 0,78 dosahovala hodnoty vypovídající o polydisperzní povaze vytvořených částic a ukazuje na vznik agregátů částic.

Pro odstranění tvorby agregovaných částic z chitosanu a pro zlepšení vlastností s cílem připravit částice s homogenní distribucí velikostí, byl zvolen jiný objemový poměr chitosanu a TPP a zvolena jiná metoda přípravy částic. Tyto požadavky byly voleny v souladu s účelem dalšího použití částic pro potenciální transportní systém. V porovnání s CS-TPP (2 : 1) částicemi byly nové CS-TPP částice (5 : 1) více homogenní s užší distribucí velikostí, a to $186,67 \pm 18,83$ nm a PDI $0,47 \pm 0,08$. Hodnota zeta potenciálu po přípravě částic byla $2,31$ mV. Na základě těchto výsledků byly CS-TPP částice (5 : 1) shledány jako vhodnější částice pro další experimenty se snahou o vyřešení nestability částic. Dále byly CS-TPP částice (5 : 1) obaleny kyselinou hyaluronovou, čímž se docílilo velikosti $236,84 \pm 4,83$ nm s hodnotou PDI $0,24 \pm 0,04$, která vypovídá o monodisperzitě částic a jejich velmi úzké distribuci a homogenitě velikostí. Hodnota zeta potenciálu byla $-36,14 \pm 5,6$ mV a poukázala tak na stabilitu částic. Jako další druh pomerních částic byly následně připraveny PCL/CS částice. Naměřená hydrodynamická velikost částic dosahovala hodnot $249,85 \pm 12,05$ nm. Také byla sledována distribuce velikostí těchto částic, jež byly měřeny monodisperzně, avšak PDI byla $0,59 \pm 0,07$, což svědčí o polydisperzitě částic. Nicméně hodnota zeta potenciálu byla $+37 \pm 2,4$ mV, což vypovídá o dobré stabilitě částic.

Na připravené nosiče byl sorpcí anebo kovalentně navázán modelový protein ovalbumin. Účinnost vazby ovalbuminu odlišnými metodami byla vyhodnocena BCA metodou. U jednotlivých metod nebyly zaznamenány velké rozdíly v účinnosti vazby. Nejvyšší účinnost vazby ($44,38 \pm 1,67$ a $42,15 \pm 1,30$ %) metodou sorpce a adsorpční kapacitu nosiče ($50,95 \pm 1,58$ a $51,30 \pm 2,29$ %) vykazovaly HA/CS-TPP a CS-TPP (2 : 1) částice v téměř totožné míře.

Dále byla sledována míra vazby a uvolnění sorbovaného ovalbuminu v čase v PBS pufru pH 7,4 (fyziologické pH) a v 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5 (kyselejší pH), jako simulace *in vivo* prostředí. Uvolnění ovalbuminu probíhalo při fyziologické teplotě 37 °C za mírného otáčení či třepání při 1000 rpm v určitých časových intervalech. K mírnému uvolnění došlo v prvních 15 minutách u CS-TPP (2 : 1) (kolem 25 %), HA/CS-TPP částic (kolem 17 %) a u PCL/CS částic (kolem 15 %) v PBS pufru pH 7,4. V 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5 se ovalbuminu v čase uvolnilo u CS-TPP (2 : 1) a HA/CS-TPP částic kolem 15 %. K pozvolnějšimu uvolnění ovalbuminu (kolem 30 %) došlo u PCL/CS částic, kdy se ovalbumin uvolňoval postupně po dobu přibližně 30 minut.

Dále k uvolňování proteinu nedocházelo, bez ohledu na zvolené pH roztoků a jejich složení. Z tohoto důvodu bylo míchání v dalších experimentech nahrazeno třepáním při 1000 rpm. K výraznějším změnám uvolnění však ani za těchto podmínek u CS-TPP (2 : 1) a HA/CS-TPP částic nedošlo. Z PCL/CS částic se uvolnilo o něco více proteinu (přes 35 %) v prostředí PBS pH 7,4. K dalšímu uvolnění by mohlo dojít degradací částic.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Anjuère, F. et Czerkinsky, C. Immunité muqueuse et vaccination. *Médecine/sciences* 2007, **23**(4), 371-378.
- [2] Borges, O., Lebre, F., Bento, D., Borchard, G. et Junginger, H. E. Mucosal Vaccines: Recent Progress in Understanding the Natural Barriers. *Pharmaceutical Research* 2010, **27**(2), 211-223.
- [3] Rhee, J. H., Lee, S. E. et Kim, S. J. Mucosal vaccine adjuvants update. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 2012, **1**(1).
- [4] Sinani, G., Sessevmez, M., Gök, M. K., Özgümüş, S., Alpar, H. O. et Cevher, E. Modified chitosan-based nanoadjuvants enhance immunogenicity of protein antigens after mucosal vaccination. *International Journal of Pharmaceutics* 2019, **569**.
- [5] Srivastava, A., Gowda, D. W., Madhunapantula, S. W., Shinde, Ch. G. et Iyer, M. Mucosal vaccines: a paradigm shift in the development of mucosal adjuvants and delivery vehicles. *APMIS* 2015, **123**(4), 275-288.
- [6] Virdi, V., P. Juarez, V. Boudolf et A. Depicker. Recombinant IgA production for mucosal passive immunization, advancing beyond the hurdles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, **73**(3), 535-545, doi:10.1007/s00018-015-2074-0.
- [7] Lambrecht, B. N., Kool, M., Willart, M. A. M. et Hammad, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology* 2009, **21**(1), 23-29.
- [8] Agrebi, S. et A. Larbi. Use of artificial intelligence in infectious diseases. *Artificial Intelligence in Precision Health*. Elsevier, 2020, 415-438, doi:10.1016/B978-0-12-817133-2.00018-5.
- [9] Tao, X. et A. Xu. Basic Knowledge of Immunology. *Amphioxus Immunity*, Elsevier, 2016, 15-42, doi:10.1016/B978-0-12-849903-0.00002-6.
- [10] Coffman, R. L., Sher, A. et Seder R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity* 2010, **33**(4), 492-503.
- [11] Dáňová, J. et Částková, J. *Očkování v České republice*. 1. Praha: Triton, 2008, 103 s. ISBN 978-80-7387-122-2.
- [12] Minor, P. D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology* 2015, **479-480**, 379-392.
- [13] Cox, R. J., Brokstad, K. A. et Ogra, P. Influenza Virus: Immunity and Vaccination Strategies. Comparison of the Immune Response to Inactivated and Live, Attenuated Influenza Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology* 2004, **59**(1), 1-15.
- [14] Demicheli, V., Jefferson, T., Ferroni, E., Rivetti, A. et Di Pietrantonj, C. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018, **2**(2), doi: 10.1002/14651858.CD001269.pub6.
- [15] Fischer II, W. A., Chason, K. D., Brighton, M. et Jaspers, I. Live attenuated influenza vaccine strains elicit a greater innate immune response than antigenically-matched seasonal influenza viruses during infection of human nasal epithelial cell cultures. *Vaccine* 2014, **32**(15), 1761-1767.
- [16] Brockstedt, D. G., Bahjat, K. S., Giedlin, M. A., et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nature Medicine* 2005, **11**(8), 853-860.
- [17] Blencowe, H., Lawn, J., Vandelaer, J., Roper, M. et Cousens, S. Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus. *International Journal of Epidemiology* 2010, **39**(Supplement 1), 102-109.
- [18] Metz, B., Jiskoot, W., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A. et Kersten, G. F. A. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine* 2003, **22**(2), 156-167.
- [19] Qiu, Y., Guo, L., Zhang, S. et al. DNA-based vaccination against hepatitis B virus using dissolving microneedle arrays adjuvanted by cationic liposomes and CpG ODN. *Drug Delivery* 2016, 1-8.

- [20] Lundstrom, K. Self-Replicating RNA Viruses for RNA Therapeutics. *Molecules*, 2018, **23**(12), doi:10.3390/molecules23123310.
- [21] Abdulhaqq, S. A. et Weiner, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunologic Research* 2008, **42**(1-3), 219-232.
- [22] Bröker, M., Berti, F., Schneider, J. et Vojtek, I. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” – Potential and limitations. *Vaccine* 2017, **35**(25), 3286-3294.
- [23] Webster, D. E., Gahan, M. E., Strugnell, R. A. et Wesselingh, S. L. Advances in Oral Vaccine Delivery Options. *American Journal of Drug Delivery* 2003, **1**(4), 227-240, doi: 10.2165/00137696-200301040-00002.
- [24] Goldblatt, D. Conjugate vaccines. *Clinical and Experimental Immunology* 2000, **119**(1), 1-3, doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01109.x.
- [25] Goldblatt, D. Conjugate vaccines. *Clinical and Experimental Immunology* 2000, **119**(1), 1-3.
- [26] Pollard, A. J., Perrett, K. P. et Beverley, P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein–polysaccharide conjugate vaccines. *Nature Reviews Immunology* 2009, **9**(3), 213-220.
- [27] Pace, D. Glycoconjugate vaccines. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2012, **13**(1), 11-33.
- [28] Cadoz, M. Potential and limitations of polysaccharide vaccines in infancy. *Vaccine* 1998, **16**(14-15), 1391-1395.
- [29] Michel, M. L. et Tiollais, P. Hepatitis B vaccines: Protective efficacy and therapeutic potential. *Pathologie Biologie* 2010, **58**(4), 288-295.
- [30] Dellagostin, O. A., Grassmann, A. A., Hartwig, D. D., Félix, S. R et al. Recombinant vaccines against Leptospirosis. *Human Vaccines* 2014, **7**(11), 1215-1224, doi:10.4161/hv.7.11.17944.
- [31] Uyttenhove, C. et Van Snick, J. Auto-vaccins. *Médecine/sciences* 2013, **29**(4), 425-429, doi: 10.1051/medsci/2013294017.
- [32] Giedrys-Kalemba, S., Czernomysy-Furowicz, D., Fijałkowski, K. et Jursa-Kulesza, J. Autovaccines in Individual Therapy of Staphylococcal Infections. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, Elsevier, 2018, 253-264, doi: 10.1016/B978-0-12-813547-1.00019-4.
- [33] Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuère, F., et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunology Letters* 2005, **97**(2), 181-188.
- [34] Mckee, A. S., Macleod, M. K. L., Kappler, J. W. et Marrack, P. Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge? *BMC Biology* 2010, **8**(1).
- [35] Vogel, F. R. Immunologic Adjuvants for Modern Vaccine Formulations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, **754**, 153-160.
- [36] Mao, K., Baptista, A. P., Tamoutounour, S. et al. Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature* 2018, **554**(7691), 255-259, doi: 10.1038/nature25437.
- [37] Cronin, J. G., Jones, N., Thornton, C. A., Jenkins, G. J. S., Doak S. H. et Clift, M. J. D. Nanomaterials and Innate Immunity: A Perspective of the Current Status in Nanosafety. *Chemical Research in Toxicology* 2020, **33**(5), 1061-1073, doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00051.
- [38] Woodrow, K. A., Bennett, K. M. et Lo, D. D. Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2012, **14**(1), 17-46, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150054.
- [39] Brandtzaeg, P. Function of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Antibody Formation. *Immunological Investigations*, 2010, **39**(4-5), 303-355, doi:10.3109/08820131003680369.
- [40] Cesta, M. F. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology* 2016, **34**(5), 599-60, doi: 10.1080/01926230600865531.
- [41] Dewangan, H. K. Rational application of nanoadjuvant for mucosal vaccine delivery system. *Journal of Immunological Methods* 2020, 481-482, doi: 10.1016/j.jim.2020.112791.

- [42] Oliveira, C. L., Veiga, F., Varela, C., Roleira, F., Tavares, E., Silveira, I. et Ribeiro, A. J. Characterization of polymeric nanoparticles for intravenous delivery: Focus on stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, **150**, 326-333, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.10.046.
- [43] Oliveira, L., Teixeira, F. M. E. et Sato, M. N. Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation* 2018, 1-17, doi:10.1155/2018/3067126.
- [44] Brandtzaeg, Per. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Frontiers in Immunology* 2013, **6**(4):222, doi:10.3389/fimmu.2013.00222.
- [45] Jabbal-Gill, I., Watts, P. et Smith A. Chitosan-based delivery systems for mucosal vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2012, **9**(9), 1051-1067, doi: 10.1517/17425247.2012.697455.
- [46] Holmgren, J. et Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 2005, **11**(4), 45-53.
- [47] Jain, S., Khomane, K., Jain, A. K. et Dani, P. Nanocarriers for Transmucosal Vaccine Delivery. *Current Nanoscience* 2011, **7**(2), 160-177.
- [48] Hobson, P. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods* 2003, **31**(3), 217-224.
- [49] Van Der Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Borchard, G. et Junginger, H. E. Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery* 2001, **52**(2), 139-144.
- [50] Yang, W., Peters, J. et Williams, R. O. Inhaled nanoparticles—A current review. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, **356**(1-2), 239-247, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.02.011.
- [51] Czerkinsky, C. et J. Holmgren. Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting Immunity to the Right Tissues. *Mucosal Vaccines* 2012, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 1-18, doi: 10.1007/82_2010_112.
- [52] World Health Organization (L'Organisation Mondiale de la Santé). Cholera vaccines: WHO position paper, 2017, *Wkly Epidemiol Rec* 2017; **92**:477–98.
- [53] Chadwick, S., Kriegel, Ch. et Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Advanced Drug Delivery* 2010, **62**(4-5), 394-407.
- [54] Kiyono, H. et K. IZuhara. New trends in mucosal immunology and allergy. *Allergology International*, 2019, **68**(1), 1-3, doi:10.1016/j.alit.2018.12.002.
- [55] Ryan, E. J., Daly, L. M. et Mills, K. H. G. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotechnology* 2001, **19**(8), 293-304.
- [56] Lin, Ch. Y., Lin, S., Yang, Y., Wang, J., Cheng, H. F. et Yeh, M. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases 2015, **11**(3), 650-656, doi: 10.1080/21645515.2015.1009345.
- [57] Giri, P. K. et Khuller, G. K. Is intranasal vaccination a feasible solution for tuberculosis? *Expert Review of Vaccines* 2014, **7**(9), 1341-1356, doi: 10.1586/14760584.7.9.1341.
- [58] Garg, A., Mangal, N. S., Khambete, H., Sharma, P. K. et Tyagi, R. K. *Mucosal Delivery of Vaccines: Role of Mucoadhesive/Biodegradable Polymers* 2010, **4**(2), 114-128.
- [59] Kuolee, R. et Chen W. M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2008, **5**(6), 693-702.
- [60] Burgdorf, S. et Kurts, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* 2008, **20**(1), 89-95 doi: 10.1016/j.coi.2007.12.002.
- [61] Kelsall, B. Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunology* 2008, **1**(6), 460-469.
- [62] Azizi, A., Kumar, A., Diaz-Mitoma, F., Mestecky, J. et Manchester, M. Enhancing Oral Vaccine Potency by Targeting Intestinal M Cells. *PLoS Pathogens* 2010, **6**(11).
- [63] Champion, J. A. et Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**(13), 4930-4934, doi: 10.1073/pnas.0600997103.
- [64] Rhee, J. H. Current and New Approaches for Mucosal Vaccine Delivery. *Mucosal Vaccines, Elsevier* 2020, 325-356, doi:10.1016/B978-0-12-811924-2.00019-5.
- [65] Ugwoke, M. I., Verbeke, N. et Kinget, R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001, **53**(1), 3-22.

- [66] Csaba, N., Garcia-fuentes, M. et Alonso, M. J. Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced Drug Delivery* 2009, **61**(2), 140-157.
- [67] Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, Ch., Mitter, N., Yu, Ch. et Middelberg, A. P. J. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 2014, **32**(3), 327-337.
- [68] Partidos, Ch. D. *Intranasal vaccines: forthcoming challenges* 2000, **3**(8), 273-281.
- [69] Czerkinsky, C., Anjueie, F., Mcghee, J. R. et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunological Reviews* 1999, **170**(1), 197-222.
- [70] Belshe, R., Lee, M., Walker, R. E., Stoddard, J. et Mendelman, P. M. Safety, immunogenicity and efficacy of intranasal, live attenuated influenza vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2014, **3**(6), 643-654, doi: 10.1586/14760584.3.6.643.
- [71] Azegami, T., Yuki, Y., Nakahashi, R., Itoh, H. et Kiyono, H. Nanogel-based nasal vaccines for infectious and lifestyle-related diseases. *Molecular Immunology* 2018, **98**, 19-24, doi: 10.1016/j.molimm.2017.10.022.
- [72] Newsted, D., Fallahi, F., Golshani, A. et Azizi, A. Advances and challenges in mucosal adjuvant technology. *Vaccine* 2015, **33**(21), 2399-2405.
- [73] PETROVSKY, Nikolai a Julio César AGUILAR. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* 2004, **82**(5), 488-496.
- [74] Lycke, N. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cellular Microbiology* 2004, **6**(1), 23-32.
- [75] Galli, G., K. Hancock, K. Hoschler, et al. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(19), 7962-7967, doi:10.1073/pnas.0903181106.
- [76] Jin, Z., Gao, S., Cui, X., Sun, D. et Zhao, K. Adjuvants and delivery systems based on polymeric nanoparticles for mucosal vaccines. *International Journal of Pharmaceutics* 2019, **572**, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118731.
- [77] Fahlén-Yrliid, L., Gustafsson, T., Westlund, J. et al. CD11c high Dendritic Cells Are Essential for Activation of CD4 T Cells and Generation of Specific Antibodies following Mucosal Immunization. *The Journal of Immunology* 2009, **183**(8), 5032-5041.
- [78] Lewis, D. J. M., Huo, Z., Barnett, S. et al. Transient Facial Nerve Paralysis (Bell's Palsy) following Intranasal Delivery of a Genetically Detoxified Mutant of Escherichia coli Heat Labile Toxin. *PLoS ONE* 2009, **4**(9).
- [79] Kayamuro, H., Y. Yoshioka, Y. Abe, et al. Interleukin-1 Family Cytokines as Mucosal Vaccine Adjuvants for Induction of Protective Immunity against Influenza Virus. *Journal of Virology* 2010, **84**(24), 12703-12712, doi: 10.1128/JVI.01182-10.
- [80] Xu, L., Bao, L., Li, F. et al. Intranasal Immunization of Mice with Inactivated Virus and Mast Cell Activator C48/80 Elicits Protective Immunity against Influenza H1 but not H5. *Immunological Investigations* 2014, **43**(3), 224-235.
- [81] Schemann, M., Kugler, E. M., Buhner, S., Eastwood, Ch., Jiang et J. W., Grundy, D. The Mast Cell Degranulator Compound 48/80 Directly Activates Neurons. *PLoS ONE* 2012, **7**(12).
- [82] Harandi, A. M. et Shattock, D. A priority for vaccine research. *Vaccine* 2010, **28**(12), 2363-2366.
- [83] Ferreira, L. M. B., Dos Santos, A. M., Boni, F. I. et al. Design of chitosan-based particle systems: A review of the physicochemical foundations for tailored properties. *Carbohydrate Polymers* 2020, **250**, 116968, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116968.
- [84] Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. et Zou, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 2004, **339**(16), 2693-2700.
- [85] Garg, N. K., Dwivedi, P., Jain, A., Tyagi, S., Sahu, T. et Tyagi, R. K. Development of novel carrier(s) mediated tuberculosis vaccine: More than a tour de force. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, **62**, 227-242, doi: 10.1016/j.ejps.2014.05.028.
- [86] Neumann, S., Burkert, K., Kemp, R., Rades, T., Rod Dunbar, P. et Hook, S. Activation of the NLRP3 inflammasome is not a feature of all particulate vaccine adjuvants 2014, **92**(6), 535-542, doi: 10.1038/icb.2014.21.

- [87] Sawtarie, N., Cai, Y. et Lapitsky, Y. Preparation of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles with highly tunable size and low polydispersity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, **157**, 110-117.
- [88] Borges, O., Dordeiro-da-Silva, A., Romeijn, S. G., Amidi, M., De Sousa, A., Borchard, G. et Junginger, H. E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release* 2006, **114**(3), 348-358.
- [89] Lynch, I. et Dawson, K. A.; Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today* 2008, **3**(1), 40-47
- [90] Liang, X., Gao, J., Jiang, L., Luo, J., Jing, L., Li, X., Jin, Y. et Dai, Z. Nanohybrid Liposomal Cerasomes with Good Physiological Stability and Rapid Temperature Responsiveness for High Intensity Focused Ultrasound Triggered Local Chemotherapy of Cancer. *ACS Nano* 2015, **9**(2), 1280-1293, doi: 10.1021/nn507482w.
- [91] Sawaengsak, Ch., Mori, Y., Yamanishi, K., Mitrevej, A. et Sinchaipanid N. Chitosan Nanoparticle Encapsulated Hemagglutinin-Split Influenza Virus Mucosal Vaccine. *AAPS PharmSciTech* 2014, **15**(2), 317-325.
- [92] Rizvi, Syed A. A. et Saleh, A. M.; Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2018, **26**(1), 64-70, doi: 10.1016/j.jsps.2017.10.012.
- [93] Gregory, A. E., Titball, R. et Williamson, D. Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2013, **3**.
- [94] Yu X., Trase, I., Ren, M., Duval, K., Guo, X.; Chen, Z. Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials* 2016, 1-15, 1087250, doi:10.1155/2016/1087250.
- [95] Almalik, A., Cadman, D. R., Cellesi, Ch. J., F. et Tirelli, N. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. *Journal of Controlled Release* 2013, **172**(3), 1142-1150, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.09.032.s
- [96] Chan, L. W., White, N. J. et Pun, S. H. Synthetic Strategies for Engineering Intravenous Hemostats. *Bioconjugate Chemistry* 2015, **26**(7), 1224-1236, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00070.
- [97] Oliveira, C. L., Veiga, F., Varela, C., Roleira, F., Tavares, E., Silveira, I. et Ribeiro, A. J. Characterization of polymeric nanoparticles for intravenous delivery: Focus on stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, **150**, 326-333, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.10.046.
- [98] Shen, S., Mao, Ch. Q., Yang, X., Du, X., Liu Y., Zhu, Y. et Wang, J. Cationic Lipid-Assisted Polymeric Nanoparticle Mediated GATA2 siRNA Delivery for Synthetic Lethal Therapy of KRAS Mutant Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Molecular Pharmaceutics* 2014, **11**(8), 2612-2622, doi: 10.1021/mp400714z.
- [99] Nizard, M., Diniz, M. O, Roussel, H., Tran, T., Ferreira, L. C. S., Badoual, C. et Tartour, E. Mucosal vaccines: Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites 2014, **10**(8), 2175-2187, doi: 10.4161/hv.29269.
- [100] JABBAL-GILL, Inderjit, Wu LIN, Otfried KISTNER, Stanley S. DAVIS a Lisbeth ILLUM. Polymeric lamellar substrate particles for intranasal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, **51**(1-3), 97-111.
- [101] Gupta, P. N., Khatri, K., Goyal, A. K. et Mishra, N. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Journal of Drug Targeting* 2008, **15**(10), 701-713.
- [102] Csaba, N., Garcia-Feuntes, M. et Alonso, M. J. The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2006, **3**(4), 463-478.
- [103] Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W. et Hennink, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery* 2010, **62**(1), 59-82, doi: 10.1016/j.addr.2009.11.009.

- [104] Mahapatro, A. et Singh, D. A. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology* 2011, **9**(1), doi: 10.1186/1477-3155-9-55.
- [105] Espinoza, S. M., Patil, H. I., San Martin Martinez, E., Casañas Pimentel, R. et Ige, P. P. Poly-ε-caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2020, **69**(2), 85-126, doi: 10.1080/00914037.2018.1539990.
- [106] Jesus, S., Fragal, L, E. H., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Valente, A. J. M. et Borges, O. The Inclusion of Chitosan in Poly-ε-caprolactone Nanoparticles: Impact on the Delivery System Characteristics and on the Adsorbed Ovalbumin Secondary Structure. *AAPS PharmSciTech* 2018, **19**(1), 101-113, doi: 10.1208/s12249-017-0822-1.
- [107] Woodruff, M. A. et Hutmacher, D. W. The return of a forgotten polymer Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 2010, **35**(10), 1217-1256, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [108] Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. et Cesaro, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, **455**(1), 219-228.
- [109] Nilsen-Nygaard, J., Strand, S., Vårum, K., Draget, K. et Nordgård, C. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* 2015, **7**(3), 552-579, doi: 10.3390/polym7030552.
- [110] Dodane, V. et Vilivalam, D. V. Pharmaceutical applications of chitosan. *Elsevier Science* 1998, **1**(6).
- [111] Lusiana, R. A., Sangkota, V. D. A., Sasongko, N. A. et al. Permeability improvement of polyethersulfone-polyethylene glycol (PEG-PES) flat sheet type membranes by tripolyphosphate-crosslinked chitosan (TPP-CS) coating. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020, **152**, 633-644, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.290.
- [112] Fan, W., W. Yan, Z. Xu et H. Ni. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, **95**, 258-265, doi:10.1016/j.colsurfb.2012.03.006.
- [113] Zhang, H. et Neaus, A. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* 2002, **23**(13), 2761-2766, doi:10.1016/S0142-9612(02)00011-X.
- [114] Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K. et Wasan, E. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2017, **9**(4).
- [115] Vila, A., Sánchez, S., Tobío, M., Calvo, P. et Alonso, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. *Journal of Controlled Release* 2002, **78**(1-3), 15-24.
- [116] Khademi, Farzad, Ramazan-Ali Taheri, Yousefi Avarvand, A., Vaez, H., Momtazi-Borojeni, A. A. et Soleimanpour, S. Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines? *Microbial Pathogenesis* 2018, **121**, 218-223, doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.035.
- [117] Lee, F., Park, S. J., Lee, J. H., Kim, M. S. et Kim, Ch. Preparation of chitosan-TPP nanoparticles and their physical and biological properties. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016, **11**(1), 166-167
- [118] Yang, L., Gao S., Asghar, S. et al. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its in vitro evaluation in glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015, **72**, 1391-1401, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.039.
- [119] Benabdelkamel, A. H., Masood, A. et al. Hyaluronic Acid Coated Chitosan Nanoparticles Reduced the Immunogenicity of the Formed Protein Corona. *Scientific Reports* 2017, **7**(1), 10542, doi:10.1038/s41598-017-10836-7.
- [120] Kalam, M. A. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for topical ocular delivery of dexamethasone. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016, **89**, 127-136, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.070.
- [121] Corthésa, B. et Bioley, G. Lipid-Based Particles: Versatile Delivery Systems for Mucosal Vaccination against Infection. *Frontiers in Immunology*, 2018, **9**, doi:10.3389/fimmu.2018.00431.

- [122] Moser C., Muller M., Kaeser M. D., Weydemann U., Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev Vaccines* (2013) **12**(7), 779–91, doi:10.1586/14760584.2013.811195.
- [123] Torchilin, V. P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2001, **73**(2-3), 137-172.
- [124] Talelli, M., Barz, M., Rijcken, C. J. F., Kiessling, F., Hennink, W. E. et Lammers, T. Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today* 2015, **10**(1), 93-117.
- [125] Raveendran, R. Polymeric micelles: Smart nanocarriers for anticancer drug delivery. *Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications*, Elsevier, 2018, 255-273.
- [126] Sánchez-López, E., Espina M., Doktorovova, S., Souto, E. B. et García, M. L. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye – Part II – Ocular drug-loaded lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017, **110**, 58-69.
- [127] Battaglia, L., Gallarate, M., Serpe, L., Foglietta, F., Muntoni, E., Del Pozo Rodriguez, A. et Angeles Solinis Aspiazu, M. Ocular delivery of solid lipid nanoparticles. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, Elsevier, 2018, 269-312.
- [128] Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S. et Akbarzadeh, A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2014, **44**(1), 381-391.
- [129] Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, S. A. et Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology* 2015, **6**.
- [130] Pattni, B. S., Chupin, V. V. et Torchilin, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*. 2015, **115**(19), 10938-10966.
- [131] Tafaghodi, M., Jaafari, M. et Sajaditabassi, S. Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006, **64**(2), 138-145.
- [132] Liu, H., Tu, Z., Feng, F., Shi, H., Chen, K. et Xu, X. Virosome, a hybrid vehicle for efficient and safe drug delivery and its emerging application in cancer treatment. *Acta Pharmaceutica* 2015, **65**(2), 105-116.
- [133] Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A. M. et Wilschut, J. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 2005, **23**, 26-38.
- [134] Cosco, D., Paolino, D., Muzzalupo, R., Celia, C., Citraro, R., Caponio, D. et Picci, N. Novel PEG-coated niosomes based on bola-surfactant as drug carriers for 5-fluorouracil. *Biomedical Microdevices* 2009, **11**(5), 1115-1125.
- [135] Rajera, R., Nagpal, K., Singh S. K. et Mishra, D. N. *Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System* 2011, **34**(7), 945-953.
- [136] Walker, W., Brewer, J. M. et Alexander, J. Lipid vesicle-entrapped influenza A antigen modulates the influenza A-specific human antibody response in immune reconstituted SCID-human mice. *European Journal of Immunology* 1996, **26**(7), 1664-1667.
- [137] Rentel, C. O., Bouwstra, J. A., Naisbett, B. et Junginger, H. E. Niosomes as a novel peroral vaccine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 1999, **186**(2), 161-167.
- [138] Shukla, A., Mishra, V. et Kesharwani, P. Bilosomes in the context of oral immunization: development, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today* 2016, **21**(6), 888-899.
- [139] Mann, J. F. S., Ferro, V. A., Mullen, A. B., Tetley, L., Mullen, M., Carter, K. C., Alexander, J. et Stimson, W. H. Optimisation of a lipid based oral delivery system containing A/Panama influenza haemagglutinin. *Vaccine* 2004, **22**(19), 2425-2429.
- [140] Mann, J. F. S., Scales, H. E., Shakir, E., Alexander, J., Carter, K. C., Mullen, A. B. et Ferro, V. A. Oral delivery of tetanus toxoid using vesicles containing bile salts (bilosomes) induces significant systemic and mucosal immunity. *Methods* 2006, **38**(2), 90-95. 10462023.
- [141] Shahiwala, A., Vyas, T. et Amiji, M. *Nanocarriers for Systemic and Mucosal Vaccine Delivery* 2007, **1**(1), 1-9.

- [142] Brito, Luis A., Michelle Chan, Christine A. Shaw, et al. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. *Molecular Therapy* 2014, **22**(12), 2118-2129.
- [143] Aulenta, F., Hayes, W. et Rannard, S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal* 2003, **39**(9), 1741-1771.
- [144] Wang, H., Huang, Q., Chang, H., Xiao, J. et Cheng, Y. Stimuli-responsive dendrimers in drug delivery. *Biomaterials Science* 2016, **4**(3), 375-390.
- [145] Cheng, Y. et Xu, T. The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008, **43**(11), 2291-2297.
- [146] Svenson, S. et Tomalia, D. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005, **57**(15), 2106-2129.
- [147] Caminade, A. M., Ouali, A., Laurent, R., Turrin, C. O. et Majoral, J. P. The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers. *Chemical Society* 2015, **44**(12), 3890-3899.
- [148] Esfand, R. et Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today* 2001, **6**(8), 427-436.
- [149] Cheng, Y., Zhao, L., Li, Y. et Xu, T. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chemical Society Reviews* 2011, **40**(5).
- [150] Borges, O., Borchard, G., Verhoef, J. C., De Sousa, A. et Junginger, H. E. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 2005, **299**(1-2), 155-166, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.04.037.
- [151] Berbel Manaia, E., Paiva Abuçafy, M., Chiari-Andréo, B. G., Lallo Silva, B., Oshiro-Júnior, J. A. et Chiavacci, L. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine* 2017, **12**, 4991-5011, doi:10.2147/IJN.S133832.
- [152] Lin, P., Lin, S., Wang, P. C. et Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* 2014, **32**(4), 711-726, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
- [153] Konwar, R. et Ahmed, A. B. Nanoparticle: an overview of preparation, characterization and application. *International Research Journal of Pharmacy* 2016, **4**(4), 47-57, doi: 10.7897/2230-8407.04408.
- [154] Valsesia, A., Desmet, C., Ojea-Jiménez, I., Oddo, A., Capomaccio, R., Rossi, F. et Colpo, P. Direct quantification of nanoparticle surface hydrophobicity. *Communications Chemistry*, 2018, **1**(1), doi:10.1038/s42004-018-0054-7.
- [155] Suh, H., Jeong, B., Liu, F. et Kim, S. W. *Pharmaceutical Research* **15**(9), 1495-1498, doi: 10.1023/a:1011982428413.
- [156] Park, K., Lee, S., Kang, E., Kim, K., Choi, K. et Kwon, I. Ch. New Generation of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. *Advanced Functional Materials* 2009, **19**(10), 1553-1566, doi: 10.1002/adfm.200801655.
- [157] Bento, D., Jesus, S., Lebre, F., Gonçalves, T. et Borges, O. Chitosan Plus Compound 48/80: Formulation and Preliminary Evaluation as a Hepatitis B Vaccine Adjuvant. *Pharmaceutics* 2019, **11**(2).
- [158] Lebre, F., G. Borchard, H. Faneca, M. C. Pedroso De Lima et O. Borges. Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. *Molecular Pharmaceutics* 2016, **13**(2), 472-482, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00707.
- [159] Lee, H., M. Kim, Y. Yoon et W. Park. Fluorescent Property of Chitosan Oligomer and Its Application as a Metal Ion Sensor. *Marine Drugs*. 2017, **15**(4), doi:10.3390/md15040105.
- [160] Zhao, J. et Wu, J. Preparation and Characterization of the Fluorescent Chitosan Nanoparticle Probe. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2006, **34**(11), 1555-1559, doi: 10.1016/S1872-2040(07)60015-2.
- [161] Biswas, S., Chattopadhyay, M., Sen, K. K. et Saha, M. K. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers* 2015, **121**, 403-410.

- [162] Slováková, M., Kratochvilová, V., Palarčík, J. et al. Chitosan nanofibers and nanoparticles for immobilization of microbial collagenase. *Vlákna a textil. Univerzita Pardubice*. 2016, 3,193-198.
- [163] Danaei, M., M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(2), doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- [164] Jesus, S. Freeze Dried Chitosan/Poly- ϵ -Caprolactone and Poly- ϵ -Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems 2013, **4**(7) doi:10.4172/2157-7412.1000164.
- [165] Ji, J., Hao, S., Wu, D., Huang, R. et Xu, Y. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. *Carbohydrate Polymers* 2011, **85**(4), 803-808, doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.051.
- [166] Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P. et Morris, M. A. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids* 2018, 83, 355-364, doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.010.
- [167] Almalik, A., Benabdelkamel, H., Masood, A., et al. Hyaluronic Acid Coated Chitosan Nanoparticles Reduced the Immunogenicity of the Formed Protein Corona. *Scientific Reports* 2017, **7**(1), doi: 10.1038/s41598-017-10836-7.
- [168] Srinivas, B. et Ashok, M. Immobilization of enzymes in their economic reuse. *International Journal of Engineering Sciences & Research Technology* 2018, 475-483, **7**(5).
- [169] Almalik, A., Karimi, S., Ouasti, S., Donno, R., Wandrey, Ch., Day, P. J. et Tirelli, N. Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. *Biomaterials* 2013, **34**(21), 5369-5380, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.065.
- [170] Sloat, B. R., Sandoval, M. A. et Cui, Z. Towards preserving the immunogenicity of protein antigens carried by nanoparticles while avoiding the cold chain. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, **393**(1-2), 198-203, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.003.
- [171] Jesus, S., Soares, E., Borchard, G. et Borges, O. Adjuvant Activity of Poly- ϵ -caprolactone Chitosan Nanoparticles Characterized by Mast Cell Activation and IFN- γ and IL 17 Production. *Molecular Pharmaceutics* 2017, **15**(1), 72-82, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00730.
- [172] BRAR, Satinder K. a M. VERMA. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2011, **30**(1), 4-17, doi: 10.1016/j.trac.2010.08.008.
- [173] Fábregas, A., Miñarro, M., García-Montoya, E. et Pérez-Lozano. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, **446**(1-2), doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.015.
- [174] Smith, D. M., Simon, J. K. et Baker, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology* 2013, **13**(8), 592-605, doi:10.1038/nri3488.
- [175] Behančínová, P. Vývoj chitosanových nanomateriálů s ligandem pro regenerativní medicínu. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [176] Hou, Y., Hu, J., Park, H. et Lee, M. Chitosan-based nanoparticles as a sustained protein release carrier for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2012, **100**(4), 939-947, doi:10.1002/jbm.a.34031.
- [177] Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J. et Farokhzad, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews* 2016, **116**(4), 2602-2663, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346.
- [178] Periyah, M., Halim, A. et Saad, A. Z. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy Reviews* 2016, **10**(19), doi: 10.4103/0973-7847.176545.
- [179] Brar, S. K. et Verma, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2011, **30**(1), 4-17, doi: 10.1016/j.trac.2010.08.008.

- [180] Lim, JitKang, Swee Pin Yeap, Hui Xin Che et Siew Chun Low. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters* 2013, **8**(1), doi: 10.1186/1556-276X-8-381.
- [181] Lin, P., Lin, S., Wang, P. C. et Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances* 2014, **32**(4), 711-726, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
- [182] Carvalho, T. C., Peters, J. et Williams III., R.O. Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? *International Journal of Pharmaceutics* 2011, **406**(1-2), 1-10, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.040.