

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Příprava částic chitosanu a testování jejich cytotoxicity *in vitro*
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Simona Fryszová**
Osobní číslo: **C23312**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Příprava částic chitosanu a testování jejich cytotoxicity *in vitro***
Téma práce anglicky: **Preparation of Chitosan Particles and Testing of Their Cytotoxicity *in vitro***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Seznamte se s literárními údaji týkající se vlastností, přípravy a charakterizace částic a nanočástic se zaměřením na částice chitosanu. Seznamte se s *in vitro* metodami testování cytotoxicity částic a nanočástic. Dále se seznamte s literárními údaji o využití těchto částic biomedicínských aplikacích.

Experimentální část:

1. Připravte částice chitosanu a částice chitosanu značené pomocí fluorescein isothiokyanátu. Charakterizujte tyto částice pomocí metody dynamického rozptylu světla DLS, zeta potenciálu, indexu polydispersity.

2. Stanovte cytotoxicitu chitosanových částic vůči lidským nádorovým buněčným liniím A549 a A2780. Ke stanovení cytotoxicity použijte test kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz prostřednictvím XTT, případně další metodu. U jednotlivých koncentrací fluorescenčně značených částic kvantifikujte inkorporaci do buněk A549.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem „Příprava částic chitosanu a testování jejich cytotoxicity *in vitro*“ 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 9.5. 2025

Simona Fryssová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, panu RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D., za jeho ochotu, cenné rady a trpělivost při psaní a řešení této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala paní konzultantce, doc. Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D., za pomoc při přípravě chitosanových submikročástic, za trpělivost a cenné rady při psaní diplomové práce. Zároveň děkuji paní laborantce, Bc. Ivaně Fousové, za ochotu, trpělivost, přátelský přístup a odborné vedení při práci v buněčné laboratoři. Dále chci poděkovat své kolegyni, Bc. Kateřině Štefánové, za přípravu částic z chitosanu značené fluorescenční barvivem FITC a příjemnou spolupráci v laboratoři. V neposlední řadě mé poděkování míří mé skvělé rodině a příteli za velkou podporu, lásku a trpělivost při vypracování této diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá přípravou a testováním cytotoxicity chitosanových submikročástic *in vitro*. Teoretická část podává obecný vhled do nanotechnologií v „nanomedicíně“, dále popisuje vlastnosti, přípravu, charakterizaci, stabilitu a internalizaci chitosanových submikročástic. Dále podává přehled a několik příkladů výzkumu a vývoje chitosanových materiálů v biomedicíně. Experimentální část je věnována přípravě a charakterizaci chitosanových submikročástic a jejich stabilitě při skladování. Dále je stanovena cytotoxicita *in vitro* vůči nádorovým liniím A549 a A2780 pomocí testu kvantifikace XTT. Součástí diplomové práce je také sledování míry internalizace fluorescenčně značených částic z chitosanu do buněk A549.

V diplomové práci nebyl prokázán cytotoxický účinek chitosanových submikročástic. Jejich míra internalizace byla vysoká, nově připravené částice vykazovaly nejlepší stabilitu, zatímco v kultivačních médiích byly nestabilní.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, submikročástice, cytotoxicita, XTT test, A549, A2780, buněčná internalizace

TITLE

Preparation of chitosan particles and testing of their cytotoxicity *in vitro*

ANNOTATION

The thesis deals with the preparation and *in vitro* cytotoxicity testing of chitosan submicroparticles. The theoretical part gives a general insight into nanotechnology in "nanomedicine", and describes the properties, preparation, characterization, stability and internalization of chitosan submicroparticles. It also gives an overview and several examples of research and development of chitosan materials in biomedicine. The experimental part is devoted to the preparation and characterization of chitosan submicroparticles and their stability during storage. In addition, the *in vitro* cytotoxicity against A549 and A2780 tumor lines is determined using the XTT quantification assay. The thesis also includes monitoring the degree of internalization of fluorescently labeled particles by A549 cells.

The cytotoxic effect of chitosan submicroparticles was not demonstrated in the thesis. Their internalization rate was high, the newly prepared particles showed the best stability, while they were unstable in culture media. carbon-based nanoparticles

KEYWORDS

chitosan, submicroparticles, cytotoxicity, test XTT, A549, A2780, cellular internalization

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	11
SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD	16
1 CÍL PRÁCE	17
2 TEORETICKÁ ČÁST	18
2.1 Nanotechnologie v „nanomedicině“	18
2.2 Chitosanové částice.....	22
2.2.1 Vlastnosti chitosanu	24
2.2.2 Příprava chitosanových částic.....	25
2.2.3 Charakterizace chitosanových částic	27
2.2.4 Stabilita chitosanových částic v kultivačních médiích	28
2.2.5 Internalizace chitosanových materiálů do buněk.....	30
2.3 Výzkum a vývoj chitosanových materiálů v biomedicině.....	32
2.3.1 Systémy doručování léčiv	33
2.3.2 Chitosanové materiály testovány v tkáňovém inženýrství	47
2.4 <i>In vitro</i> testování cytotoxicity chitosanových materiálů.....	49
2.4.1 MTT test	50
2.4.2 XTT test	53
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	57
3.1 Pomůcky a přístroje	57
3.2 Chemikálie a roztoky	58
3.3 Příprava roztoku chitosanu a tripolyfosfátu.....	59
3.3.1 Příprava zásobního roztoku chitosanu	59
3.3.2 Příprava zásobního roztoku tripolyfosfátu.....	59
3.4 Příprava chitosanových částic.....	60
3.4.1 Příprava fluorescenčně značených částic.....	60
3.5 Charakterizace připravených částic	61
3.5.1 Měření hydrodynamického rozptylu světla a polydisperzního indexu.....	61

3.5.2	Měření zeta potenciálu.....	61
3.5.3	Charakterizace fluorescenčně značených částic	61
3.6	Zakoncentrování chitosanových částic pro buněčný experiment	62
3.7	Příprava médií pro buněčný experiment.....	62
3.8	Příprava koncentrační řady chitosanových částic	63
3.9	Použité nádorové linie	63
3.10	Pasážování a počítání buněk	63
3.11	Stanovení cytotoxicity částic pomocí testu XTT	64
3.12	Sledování stability chitosanových částic v čase a v kultivačních médiích.....	66
3.13	Internalizace fluorescenčně značených částic chitosanu do buněk A549.....	66
3.13.1	Zakoncentrování fluorescenčně značených částic pro buněčný experiment	67
3.14	Statistická analýza.....	67
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	68
4.1	Příprava a charakterizace chitosanových částic	68
4.2	Stanovení cytotoxicity chitosanových částic pomocí testu XTT	71
4.2.1	Buněčná linie A549	71
4.2.2	Buněčná linie A2780	72
4.2.3	Hodnocení cytotoxicity chitosanových částic.....	73
4.3	Hodnocení internalizace chitosanových částic do buněk A549.....	77
4.4	Stabilita chitosanových částic v čase	83
4.5	Stabilita chitosanových částic v kultivačních médiích	86
	ZÁVĚR	89
	SEZNAM LITERATURY	90

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Aplikace nanomateriálů v medicíně.	18
Obrázek 2: Funkcionalizace povrchu nanočástic.	21
Obrázek 3: Chitosan a jeho vlastnosti, biomedicínské aplikace a struktura.	22
Obrázek 4: Deacetylace chitinu na chitosan.	23
Obrázek 5: Příprava submikročásteč chitosanu metodou iontové gelace.	26
Obrázek 6: Nanosféra a nanokapsle.	35
Obrázek 7: Teranostika.	40
Obrázek 8: Proces hojení ran.	44
Obrázek 9: Léčba hydrogelem na bázi chitosanu při popáleninových stavech 2. stupně.	46
Obrázek 10: Regenerace kloubní chrupavky skafoldem na bázi chitosanu.	48
Obrázek 11: Princip tetrazoliových testů.	51
Obrázek 12: Redukce tetrazoliových solí MTT na nerozpustný formazán.	51
Obrázek 13: Redukce tetrazoliové soli XTT na rozpustný formazán.	56
Obrázek 14: Výpočet viability buněk A549 a A2780.	65
Obrázek 15: Fluorescenční zobrazení částic CS/TPP v buňkách A549.	80

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Ředění zásobního roztoku částic CS/TPP pro XTT test	63
Tabulka 2: Hodnocení připravených částic CS/TPP v režimu „monodisperzně“ a „polydisperzně“	69
Tabulka 3: Charakterizace CS/TPP pro buněčné experimenty	69
Tabulka 4: Submikročástice FITC-CS/TPP a jejich DLS, PDI a zeta potenciál.....	78
Tabulka 5: Stabilita skladovaných submikročástic CS/TPP v čase	83
Tabulka 6: Stabilita submikročástic CS/TPP v kultivačních médiích.....	87

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Vliv chitosanových částic na viabilitu buněčné linie A549	72
Graf 2: Vliv chitosanových částic na viabilitu buněčné linie A2780	73
Graf 3: Procentuální množství inkorporovaných částic do buněk A549	78
Graf 4: Stabilita skladovaných částic CS/TPP v čase.....	84

SEZNAM ZKRATEK

A2780	karcinom ovaríí
A549	nemalobuněčný adenokarcinom plic
ABCB1	člen rodiny B transportérů ABC 1
ATP	adenosintrifosfát
BBB	hematoencefalická bariéra, z angl. Blood-Brain Barrier
CNS	centrální nervová soustava
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019, z angl. Coronavirus Disease 2019
CRISPR/Cas9	pravidelně se střídající krátké palindromické repeticce / CRISPR-asociovaný protein 9, z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein 9
CS	chitosan
DA	stupeň acetylace
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DD	stupeň deacetylace
DDS	systém doručování léčiv z angl. Drug-Delivery System
DLS	hydrodynamický rozptyl světla
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
ECR	Electron-coupling reagent
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPR	Enhanced Permeability and Retention

FBS	fetální bovinní sérum
Fe ₃ O ₄	magnetit – oxid železnato-železitý
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
HIV-1	lidský virus imunodeficiency typu 1, z angl. Human Immunodeficiency Virus Type 1
HSV-1	Herpes simplex virus 1
IC ₅₀	inhibiční koncentrace 50 %
MALT	slizniční lymfatická tkáň, z angl. Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MEM	minimum essential medium
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3 karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)
MW	molekulová hmotnost
NALT	lymfoidní tkáň asociovaná s nosní sliznicí, z angl. Nasal-Associated Lymphoid Tissue
NPs	nanočástice, z angl. Nanoparticles
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PDI	polydisperzní index
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů v roztoku
pKa	disociační konstanta
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	poly (kyselina mléčná-ko-glykolová)

PMS	fenazinmethosulfát
PTX	paklitaxel
PVA	polyvinylalkohol
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPMI	Roswell park memorial institute
SDS	dodecylsulfát sodný
siRNA	malá interferující RNA, z angl. Small Interfering RNA
TPP	tripolyfosfát sodný
TRITC	tetramethylrhodamin isothiokyanát
WHO	světová zdravotnické organizace, z angl. World Health Organization
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2Htetrazolium
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H tetrazolium-5-karboxanilid
ZnO	oxid zinečnatý
K _m	Michaelisova konstanta
V _{max}	maximální rychlost

ÚVOD

S rychlým rozvojem nanotechnologií a rostoucím využitím nanomateriálů v medicíně, farmacii, potravinářství i průmyslu se stále více dostává do popředí otázka jejich toxikologického hodnocení. Díky svým specifickým vlastnostem, jako je malá velikost, velký měrný povrch a schopnost interagovat s biologickými strukturami na buněčné i subcelulární úrovni, mohou tyto materiály vykazovat potenciální nežádoucí účinky (Pratap Singh et al., 2017). Ty mohou vést k oxidativnímu stresu, poruchám hemostázy, prozánětlivé reakci či cytotoxickému poškození. Z tohoto důvodu je *in vitro* a *in vivo* testování biokompatibility a toxicity nezbytným předpokladem pro bezpečnou aplikaci nanomateriálů v klinické i experimentální biomedicíně (Parde-Schrepler et al., 2017).

Zvláštní pozornost je věnována chitosanu, přírodnímu polysacharidu s bioadhezivními, antimikrobiálními a biokompatibilními vlastnostmi, který je zkoumán a vyvíjen k uplatnění v celé řadě lékařských aplikací (Abbasi et al., 2024). Jeho nano- a mikročásticové formy jsou intenzivně testovány jako nosiče léčiv, zejména díky možnosti řízeného uvolňování a cíleného transportu. Přestože je chitosan obecně považován za netoxický a biokompatibilní, jeho formulace ve formě částic může vykazovat odlišné interakce s buňkami v závislosti na jejich velikosti, zeta potenciálu nebo koncentraci (Zeng et al., 2021). Proto je hodnocení jejich cytotoxicity klíčové jak pro predikci biologické odezvy, tak pro optimalizaci konstrukčních parametrů částic s ohledem na jejich cílové použití (Abbasi et al., 2024).

Diplomová práce se zabývá přípravou částic z chitosanu a testováním jejich cytotoxicity *in vitro* na nádorových liniích A549 (nemalobuněčný adenokarcinom plic) a A2780 (karcinom ovarí). Buněčná viabilita byla hodnocena kolorimetrickým XTT testem. Částice z chitosanu byly analyzovány z hlediska časové stability při skladování i po přidání do kultivačního média. Dále byla sledována jejich procentuální míra internalizace do buněk pomocí fluorescenčně značených částic z chitosanu.

1 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo seznámit se s vlastnostmi, přípravou, metodami charakterizace částic a nanočástic chitosanu a jejich využití v biomedicínských aplikacích. Dalším cílem této části bylo seznámit se s *in vitro* metodami testování cytotoxicity částic a nanočástic.

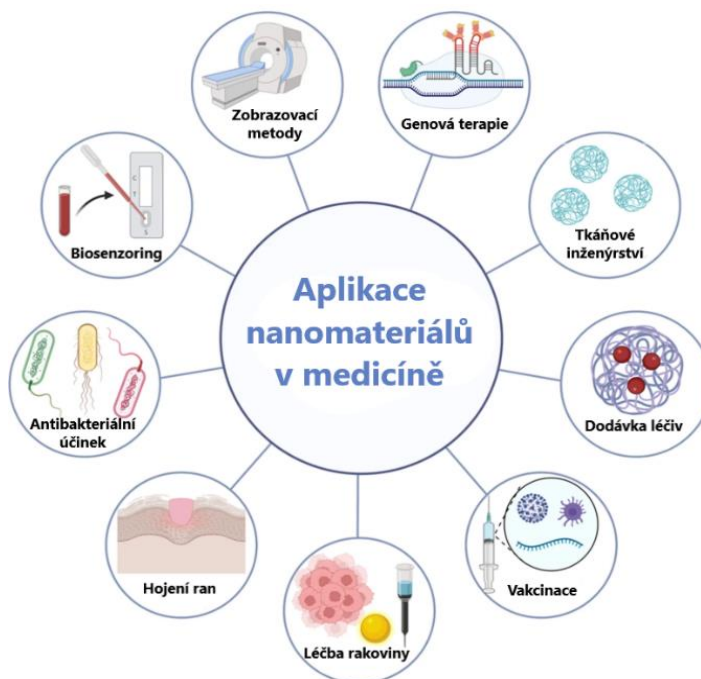
Cíle experimentální části:

- příprava částic z chitosanu značené fluorescein isothiokyanátem a bez značení.
- charakteristika částic pomocí hydrodynamického rozptylu světla (DLS), zeta potenciálu a indexu polydisperzity
- stanovení cytotoxicity částic vůči lidským nádorovým buněčným liniím A549 a A2780 pomocí testu kvantifikace aktivity mitochondriálních dehydrogenáz prostřednictvím XTT
- kvantifikace míry internalizace fluorescenčně značených částic chitosanu do buněk A549
- sledování stability skladovaných chitosanových částic v čas a stabilitu těchto částic po přípravě v kultivačních médiích MEM a RPMI

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanotechnologie v „nanomedicině“

Nanotechnologie je interdisciplinární obor, který spojuje různé disciplíny, přes biologické vědy, bioinženýrství, potravinářství, až po medicínu. To vede k rozvoji nové technologické éry. Nejvýznamnější oblastí nanotechnologie je „nanomedicina“, která používá nanomateriály v diagnostice, prevenci a léčbě nemocí v molekulárním měřítku s využitím molekulárních znalostí lidského těla. Nanomateriály podle definice nabývají velikosti aspoň v jednom rozměru od 1 do 100 nm. Určitým prostorovým uspořádáním mohou vytvářet nanosféry, nanovlákná, nanotrubičky a další. Nanomateriály disponují odlišnými vlastnostmi v nanosvětě oproti makrosvětě (Pratap Singh et al., 2017). Pro své charakteristické vlastnosti se v medicíně řada polymerních (Englert et al., 2018), kovových (Habas et al., 2018), lipidových (Zhang et al., 2024), nebo uhlíkových materiálů (Yoo et al., 2022) využívá k léčebným technikám. Tyto techniky využívají nanomateriály k cílené doručení léčiv (Medha et Sapna Sethi, 2024), v tkáňovém inženýrství (Roshanbinfar et al., 2023), diagnostice (biosenzory), zobrazovacím technikám (kontrastní látky), fototerminální nebo antimikrobiální terapii a další (Multari et al., 2018, Wisielewska et al., 2022). Schéma obr. č. 1 představuje několik odvětví medicíny, ve kterých jsou nanočástice široce studovány v rámci *in vitro* a *in vivo*.



Obrázek 1: Aplikace nanomateriálů v medicíně, převzato a upraveno podle Abbasi et al., 2023.

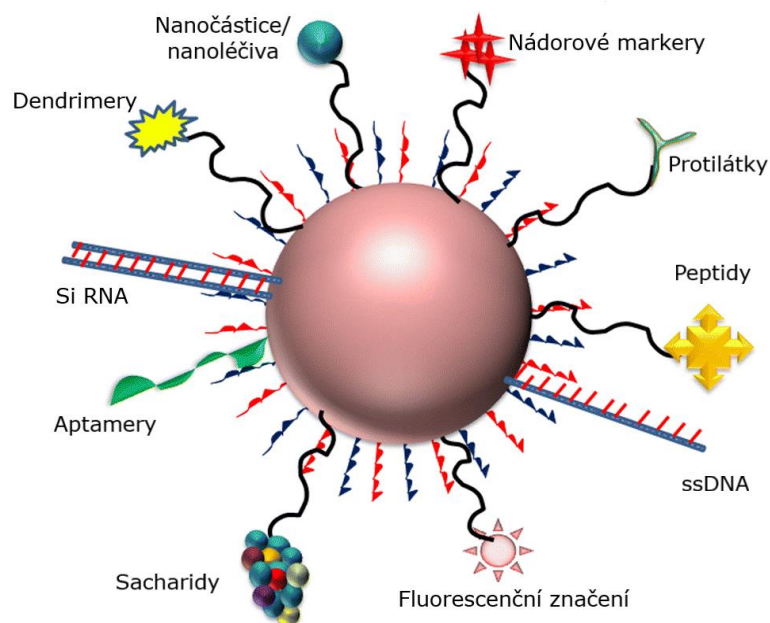
V důsledku jejich malé velikosti a vysokého poměru plochy povrchu k hmotnosti jsou nanočástice biologicky reaktivnější oproti větším. Na druhou stranu, z důvodu velkého povrchu nanočástic, dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které vedou k produkci zánětlivé odpovědi. Obecně se uvádí, že menší nanočástice mají vyšší buněčnou absorpci a vyšší cytotoxicitu. Parde-Schrepler a et al. ve své práci potvrdili, že se toxicita nanočástic stříbra (5 nm, 10 nm, 25 nm, 50 nm a 110 nm) zvyšovala s jejich snižující velikostí (Parde-Schrepler et al., 2017). V práci Huo et al. zjistili, že zlaté nanočástice menší než 6 nm účinně vstupují do buněčného jádra, zatímco velké nanočástice (10 a 16 nm) pronikají pouze buněčnou membránou a nacházejí se v cytoplazmě (Huo et al., 2014). Podobně v práci Zeng et al. byla potvrzená významná závislost malých nanočástic titanu (10 nm) na vzniku cytotoxicity. Zeng a kol. zároveň porovnávali koncentrace (tj. 1 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml) čtyř velikostí nanočástic (tj. 10 nm, 30 nm, 50 nm, 100 nm), přičemž byl prokázán jasný vztah mezi dávkou a účinkem. Jinými slovy řečeno, malé částice s vyšší koncentrací disponují elevací cytotoxicity než větší částice s nižšími koncentracemi (Zeng et al., 2018).

K dalším fyzikálně-chemickým vlivům toxicity a biokompatibility nanočástic na organismus patří změna morfologie – tvaru, povrchový náboj nebo modifikace povrchu částic. Chu et al. zkoumali vliv tvaru a povrchové chemie na nanočástice na bázi zlata. Zjistili, že částice s ostrými hranami, jako jsou nanodiamanty, nanotrubičky a nanohvězdy, vykazovaly vyšší míru absorpce do buněk a nižší míru vylučování ve srovnání s nanosférami. Výzkumný tým uvedl, že rychlejší vstup částic do buněk a pomalejší vylučování souvisí s mechanickým poškozením buněčné membrány a endozomů. Ve své práci zároveň dospěli k závěru, že povrchová modifikace těchto částic neměla výrazný vliv na rychlost vylučování oproti nemodifikovaným nanokuličkám. Nanočástice byly funkcionalizovány vrstvami oxidu křemičitého a polyethylenglykolem (PEG) (Chu et al., 2014). Kumarasamy a kol. v experimentu testovali stříbrné nanočástice nanokuliček, nanokrychlí, nanotyček a nanotrojúhelníků o velikosti 50 nm. Nejvyšší míru toxicity představovaly nanotyče při nízkých koncentracích (1 µg/ml, 10 µg/ml a 20 µg/ml), které snížily viabilitu buněk na 20 %. Nanokrychle snížily viabilitu také na 20 % při nejvyšších koncentracích (tj. 50 µg/ml a 100 µg/ml) (Kumarasamy et al., 2022). Nanotrojúhelníky a nanosféry nevykazovaly signifikantní snížení životaschopnosti buněk. Podobně Nunes et al. zabývající se mitochondriální toxicitou uvádějí vyšší míru toxicity nanotubic na bázi zlata oproti nanokuličkách. Zjistili, že částice

způsobují disipaci membránového potenciálu, což znamená, že dochází k vyrovnání rozdílu nábojů a pH mezi matrix a mezimembránovým prostorem mitochondrie (Nunes et al., 2022).

Nanočástice mohou mít negativní, pozitivní nebo neutrální povrchový náboj v závislosti na jejich povrchových funkčních skupinách. Povrchový náboj částic ovlivňuje interakce mezi buněčnou membránou, proteinovou korónou a následně buněčnou absorpcí. V nedávné studii Chen et al. testovali vliv povrchových ligandů a povrchového náboje na inhibici proliferace herpes simplex viru 1 (HSV-1). Syntetizovali nanočástice selenu a modifikovali jejich povrchy k dosažení pozitivního, neutrálního a negativního náboje. Data výzkumu Chen et al. ukázala, že ačkoliv částice selenu s negativním nábojem měly vyšší hydrofilitu, rychlost absorpce byla nižší ve srovnání s částicemi s pozitivním a neutrálním nábojem. Zároveň zjistili, že nanočástice se záporným nábojem mají vysokou afinitu k proteinu HSV-1, což odpovídá zvýšené aktivitě anti-HSV-1 a ochranu buněk proti těmto virům (Chen et al. 2025).

Biokompatibilita částic je jednou z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje jejich toxicitu. Díky možnosti modifikace fyzikálně-chemických vlastností je možné zlepšit jejich biokompatibilitu a účinnost příjmu prostřednictvím funkcionalizace povrchu. Modifikace povrchu je nezbytná, protože vysoce reaktivní kovové nanočástice snadno oxidují a vysoký stav reaktivity částic představuje zdravotní riziko pro pacienty. Funkcionalizace zahrnuje proces, jehož cílem je zlepšit nebo přidat vlastnosti užitečné pro použití těchto částic v lékařských aplikacích. Obecně je povrchová modifikace založena na použití homo- nebo heterobifunkčních crosslinkerů (zesíťování) s cílem přidat organickou funkční skupinu ($R-NH_2$, $R-COOH$, a další), užitečnou pro navázání biologických molekul (tj. nanoléčiva, dendrimery, nádorové markery, sacharidy, fluorescenční značení, peptidy a protilátky) (Das et al., 2017, Kumar et al., 2023). Tyto modifikace jsou znázorněny na obr. č. 2.



Obrázek 2: Funkcionalizace povrchu nanočástic, převzato a upraveno podle Kumar et al., 2023.

V systémové cirkulaci se mohou na povrch nanočástic absorbovat různé proteiny. Těmito proteiny mohou být albumin, imunoglobuliny a další funkční biomolekuly. Ty pak tvoří „proteinovou korónu“, která mění jejich povrchové vlastnosti a tím absorpci, biodistribuci rychlost odstranění z organismu. Proteinová koróna může tak stimulovat nebo potlačovat imunitní odpověď a cytotoxické účinky. K eliminaci změn způsobené proteinovým obalem koróny se využívá výše zmíněná metoda modifikace povrchu nanočástic (Das et al., 2017, Yuo et al., 2018). V práci Jiao et al. použili k funkcionalizaci zlatých nanočástic polyethylenglykol (PEG) (Jiao et al., 2020). Parades Guerrero et al. na stříbrných nanočásticích poly (kyselinu mléčnou-ko-glykolovou) (PLGA) a kyselinu polymléčnou (PLA) (Parades Guerrero et al., 2019).

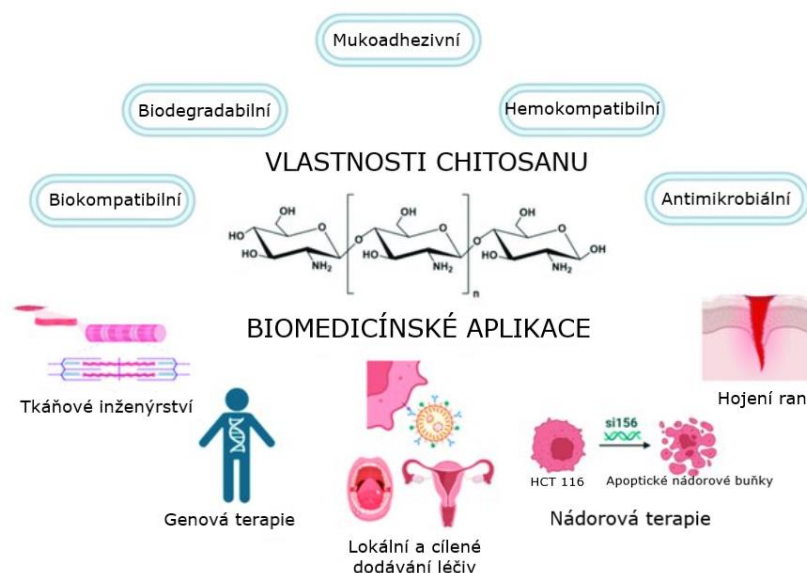
Z hlediska nanomedicíny představují polymerní nanomateriály zvláště důležitou skupinu, která se díky své variabilitě, funkčnosti a biologické kompatibilitě stává nedílnou součástí moderních léčebných přístupů. Přírodní polymery, jako jsou kyselina hyaluronová (Maiz-Fernández et al., 2021), pektin (Seyam et al., 2024), alginát (Zhao et al., 2021), celulóza (Sumitha et al., 2023), či chitosan (Zeng et al., 2021), vynikají přirozenou bioaktivní povahou a odbouratelností. Syntetické polymery, jako je PEG, PCL (polykaprolakton) (Onsaloo et al., 2023), nebo PLGA, poskytují vyšší strukturální stabilitu a možnost chemické modifikace (Englert et al., 2018). Chitosan, jeden z nejvíce studovaných přírodních polymerů, přitahuje pozornost zejména díky svým antimikrobiálním účinkům, schopnosti podporovat hojení ran

a využitelnosti v systémech cíleného doručování léčiv (Zeng et al., 2021). Právě jeho jedinečné vlastnosti a aplikační potenciál jsou předmětem následujících kapitol.

2.2 Chitosanové částice

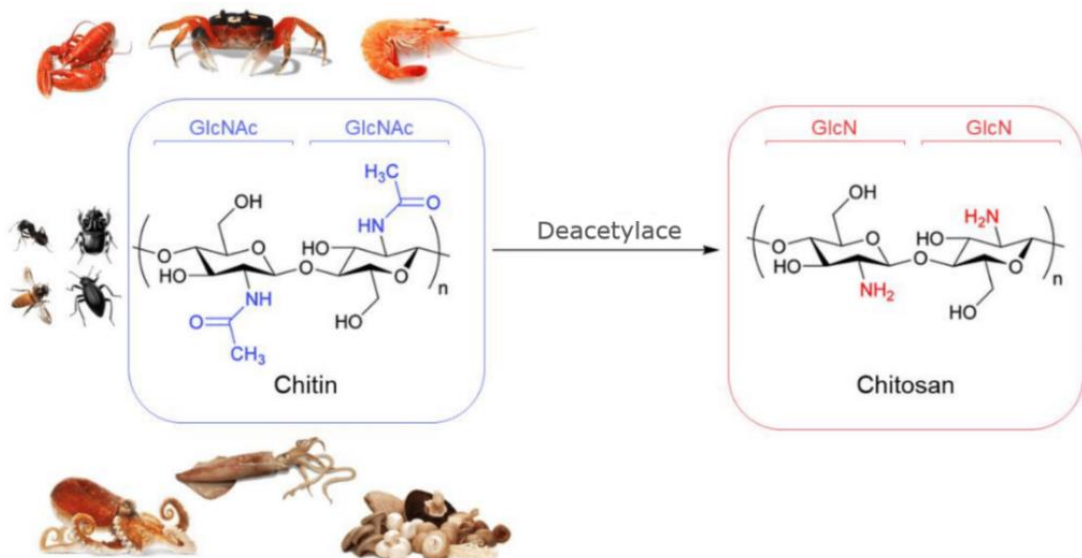
Chitosan (CS), derivát přírodního polysacharidu chitinu, je po celulóze druhým nejrozšířenějším polysacharidem na světě. Díky svým vlastnostem, jako je biokompatibilita, biodegradace, antibakteriální účinek a mukoadheze, je chitosan široce používán v biomedicínských aplikacích, potravinářství, kosmetice, tkáňovém inženýrství a v čištění pitné vody. V medicínském významu svou roli zastává výhradně jako nosič v oboru cíleného doručování léčiv (Zeng et al., 2021). Lze jej využívat jako samotný polymer, jeho deriváty (například trimethylchitosan – TMC) nebo častěji povrchově modifikovaný s částicemi toxičtějšího charakteru (například částice z kovů). Modifikací jiných druhů částic chitosan zlepšuje jejich stabilitu *in vivo/in vitro*, biokompatibilitu a další vlastnosti uvedeny výše. Zároveň snižuje zmiňovanou toxicitu, která je rozhodující vlastností pro užívání částic napříč všemi obory (Shirazi et al., 2015, Sayem et al., 2024).

Chitosan má lineární strukturu a řadí se mezi kationtové přírodní polymery hydrofilní povahy. Ve své struktuře obsahuje velké množství hydroxylových (–OH) a aminových (–NH₂) funkčních skupin, které lze použít k modifikaci povrchu nanočástic *in situ* a *in vitro* (Oudih et al., 2022). Obr. č. 3 představuje vlastnosti, strukturu a aplikace chitosanu v biomedicíně.



Obrázek 3: Chitosan a jeho vlastnosti, biomedicínské aplikace a struktura, převzato a upraveno podle Milenkova et al., 2024.

Chitin, chemicky přeměňován na chitosan, je přirozeně vyskytující se polysacharid v přírodě. Je přítomen v exoskeletech členovců (korýši, hmyz), ve stěnách buněk hub a některých řas (Guarnieri et al., 2022). Struktura chitinu je tvořena dlouhými řetězci $\beta(1\rightarrow4)$ -vázaných N-acetyl-D-glukosaminových jednotek, což je derivát glukózy, obsahující acetylovou skupinu (Rakshit et al., 2023). Pro své specifické vlastnosti je nerozpustný ve vodě a většině běžných rozpouštědel. Chitosan je však rozpustný v kyselých roztocích, což usnadňuje jeho další použití. Volné aminovým skupiny mu poskytují antibakteriální vlastnosti a schopnost podporovat hojení ran. Chitin takovou aktivitu nevykazuje. Chitosan je vysoce biokompatibilní a snadno biodegradovatelný na biologicky neškodné produkty, což je zásadní pro medicínské využití. Chitin je také biokompatibilní, ale kvůli nerozpustnosti je méně flexibilní při použití. Z výše uvedených skutečností, je proto chitin přeměňován (nejčastěji deacetylován) na víceúčelový derivát chitosan (Zeng et al., 2021, Rakshit et al., 2023). Schéma na obr. č. 4 představuje deacetylaci chitinu na chitosan a zobrazuje jejich struktury.



Obrázek 4: Deacetylase chitinu na chitosan, převzato a upraveno podle Fatimi, 2022.

2.2.1 Vlastnosti chitosanu

V běžných organických rozpouštědlech nelze dosáhnout rozpuštění chitosanu. Na druhou stranu je rozpustný ve zředěných roztocích kyselin a jeho rozpustnost závisí na stupni deacetylace a molekulární hmotnosti. Pro přípravu roztoku se nejčastěji používá kyselina octová, ale i mléčná, citrónová, chlorovodíková nebo kyselina mravenčí (Sikorski et al., 2021). Větší molekulová hmotnost vede k vyšší viskozitě a naopak. Obecně je vysoce rozpustný v kyselém roztoku, při pH nižší než 6,2, kde se protonuje a získává kladný náboj, což z něj vytváří kationtový polymer (Lewandowska, 2015). Když se však pH zvýší nad 6,2 aminové skupiny zbytků chitosanu jsou deprotonovány a biopolymer ztratí svůj náboj, což vede k jeho nerozpustnosti (Boza et al., 2019).

Aminové skupiny chitosanu jsou kladně nabitě v kyselém prostředí a poskytují silnou elektrostatickou interakci se záporně nabitými povrchy sliznic nebo jinými makromolekulami, například buněčné membrány, DNA nebo proteiny. Chitosan tímto disponuje vysokou mukoadhezivní a komplexotvornou vlastností. Vzhledem k tomu, že chitosan je slabá báze (polykationt) s $pK_a = 6,5$, je pH důležitým parametrem pro řízení stupně protonace aminoskupin (jako NH_3^+), které řídí tvorbu komplexu s vysoce záporně nabitou DNA (Bravo-Anaya et al., 2019). Při pH vyšším, než pK_a má chitosan tendenci ztrácet svůj kladný náboj a v důsledku deprotonace aminoskupin se sráží a stává se nerozpustným. To je vysvětleno skutečností, že většina aminoskupin ztrácí svůj náboj při pH blízkém 7. Ačkoli při pH vyšším než 7, je chitosan deprotonován, stále zůstává reaktivní a má možnost vytvářet gely nebo ochranné filmy, což je významné v odvětví tkáňového inženýrství. (Englert et al., 2018).

Chitosan má jedinečnou polykationtovou charakteristiku v kyselých roztocích, kde jsou jeho aminoskupiny ($-NH_2$) protonovány, díky čemuž je rozpustný ve vodném kyselém prostředí. Naopak v alkalickém prostředí aminoskupiny ztrácejí své kladné náboje, což způsobuje, že se chitosan stává nerozpustným. Jeho kationtová povaha má schopnost zvýšit paracelulární permeabilitu peptidových léčiv přes slizniční epitel. Mimo to, volné aminové skupiny chitosanu umožňují chemické úpravy, například připojení léčiv, růstových faktorů nebo jiných biologicky aktivních látek (Sayem et al., 2024).

Nejdůležitějším parametrem charakterizujícím vzorek chitosanu je stupeň deacetylace (DD). Chitosan je získán částečnou deacetylací chitinu, který obsahuje náhodně distribuované jednotky složené z β -(1→4)-spojených D-glukosaminových a N-acetyl-D-glukosaminových jednotek a tvoří tak lineární strukturu. Poměr mezi těmito dvěma jednotkami určuje stupeň

deacetylaci, který je klíčovým parametrem jeho biologických, fyzikálně-chemických a mechanických vlastností. Stupeň deacetylaci chitosanu určuje množství acetylových skupin, které byly odstraněny ze struktury chitosanu, přičemž na polysacharidu zůstaly volné aminoskupiny, odtud název deacetylaci. Čím vyšší je stupeň deacetylaci, tím více dostupných aminových skupin je vystaveno jako potenciální vazebná místa pro navázání různých látek. Chitosan s vysokým stupněm deacetylaci má vyšší rozpustnost v kyselých roztocích a kladný povrchový náboj. Obecně platí, že chitosan s vyšším DD, vykazuje lepší biologické vlastnosti než méně deacetylovaný chitosan (Mathaba et Darabola, 2020). Stupeň deacetylaci komerčně používaného chitosanu se pohybuje v rozmezí 75–85 % (Van Bavel et al., 2023).

Další významnou vlastností chitosanu, je molekulová hmotnost, která je vyjádřena jako průměr veškerých molekul přítomných ve vzorku. Podle způsobu přípravy různých komponentů (nanočástice, hydrogely a další), lze chitosan rozdělit na chitosan s nízkou, střední, nebo vysokou molekulovou hmotností (MW). Obecně je vysokomolekulární chitosan méně degradovatelný, a tím více stabilní. Viskozita polymeru je závislá na jeho molekulární hmotnosti (Chaiwong et al., 2020). Čím vyšší je jeho molekulární hmotnost, tím i viskozita roztoku je vyšší a naopak. Zároveň chitosan s nižší molekulární hmotností je snadno rozpouštěn ve vodných roztocích, čímž snadno proniká do nitra buňky, kde působí svým antibakteriálním účinkem. Pro přípravu hydrogelů nebo čištění povrchových vod se naopak používá chitosan s vysokou molekulární hmotností. Vzhledem k odlišným biologickým vlastnostem a konkrétnímu použití, je důležité brát zřetel na molekulární hmotnost (Minh et al., 2017). Nízkomolekulární chitosan vykazuje lepší rozpustnost, biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost a menší míru toxicity ve srovnání s vysokomolekulárním chitosanem, z tohoto důvodu je upřednostňován a využíván v medicínských aplikacích (Iswanti et al., 2018).

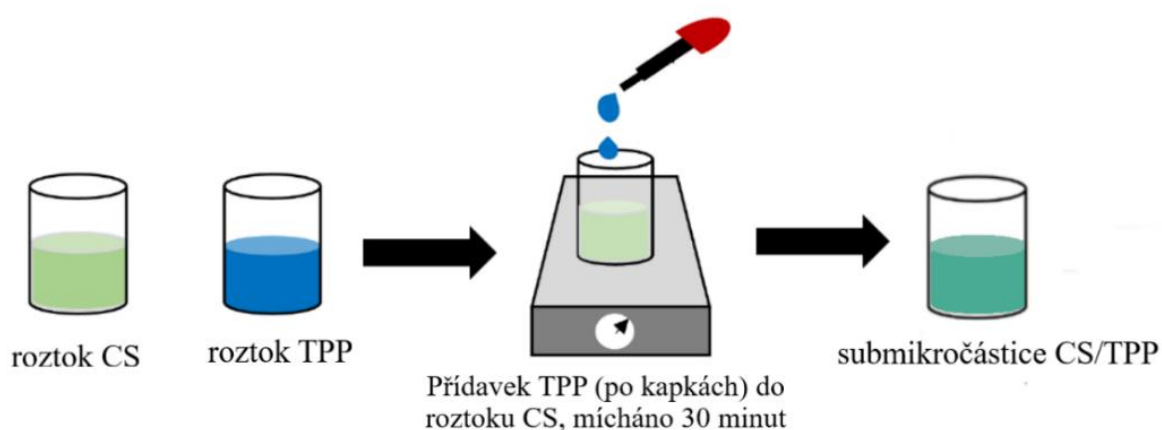
2.2.2 Příprava chitosanových částic

Chitosan je syntetizován částečnou nebo úplnou deacetylací (alkalickou hydrolyzou) chitinu. Příprava nanočástic chitosanu nejčastěji vzniká iontovou gelací síťováním tripolyfosfátu sodného (TPP) za tvorby pevné sítě (Zhang et al., 2024). Pro přípravu roztoku chitosanu, síťovaným tripolyfosfátem, se nejčastěji používá k jeho rozpuštění kyselina octová (Sikorski et al., 2021). Metoda zahrnuje tvorbu komplexů mezi kladně a záporně nabitými částicemi po mechanickém míchání, přičemž se chitosan odděluje na kulovité částice různých velikostí a povrchových nábojů. Technika iontové gelace je často atraktivní vzhledem k

potřebám mírného zpracování, zahrnujícího vodné prostředí s nízkou toxicitou a jednoduchými podmínkami pro enkapsulaci léčiva. Oproti jiným metodám představuje značné výhody (Rázga et al., 2016).

Nano-, submikro- a mikročástice se získávají spontánně za mírných kontrolních podmínek bez použití vysokých teplot, provádí se při laboratorní teplotě. Nejsou používány organická rozpouštědla, toxické látky nebo složitá zařízení. Chitosan a TPP jsou dobře přístupné a cenově výhodné materiály, což dělá metodu finančně nenáročnou (de Pinho Neves et al., 2014). Ačkoli výše zmíněné faktory představují značné výhody, zásadní a poměrně obtížnou roli hraje konstantní rychlost přidavku tripolyfosfátu do roztoku chitosanu, rychlost míchání, objemový poměr CS/TPP, pH roztoků CS a TPP. Tyto skutečnosti zásadně ovlivňují velikost, jejich míru distribuce, agregaci a povrchový náboj submikročástic (Rázga et al., 2016).

Tripolyfosfát sodný je multivalentní polyaniont s nízkou toxicitou a cenou, nepředstavuje žádná závažná omezení manipulace a skladování. Po přidání roztoku TPP se vytvoří částice prostřednictvím intermolekulárních a intramolekulárních vazeb vytvořených mezi fosfátovými skupinami TPP a chitosanovými aminoskupinami. Obecně se při této metodě nanočástice připravují přidáním roztoku TPP po kapkách (pH 7–9) do kyselého roztoku (pH 4–6) chitosanu (de Pinho Neves et al., 2014). Přípravu chitosanu znázorňuje obr. č. 5.



Obrázek 5: Příprava submikročástic chitosanu metodou iontové gelace, převzato a upraveno podle Van Bavel et al., 2023.

Částice chitosanu lze připravovat i dalšími metodami. Obecně je příprava částic rozdělená na dva přístupy, „zdola nahoru“ a „shora dolů“. Metody „zdola nahoru“ zahrnují

ionotropní gelaci zmíněnou výš, mikroemulzní metodu, nanoprecipitaci nebo například polyelektrolytovou komplexaci. Metody „shora dolů“ ultrazvukovou homogenizaci (sonikace), spray drying (sušení rozprašováním), nebo přípravu pomocí elektrospreje (elektrostatické rozprašování) (Jhaveri et al., 2021).

2.2.3 Charakterizace chitosanových částic

Částice disponují mnoha fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které lze dnes moderními metodami změřit a vyhodnotit. Takto lze i zjistit, zda byla výroba nanomateriálů správně provedená. Jedním z nejdůležitějších cílů měření, je stanovení jejich velikosti, tvaru nebo povrchového náboje. Těmito metodami analyzujeme i jejich tvar. Velikost částic lze změřit pomocí hydrodynamického rozptylu světla (DLS). Míru distribuce částic v roztoku měříme pomocí DLS přístroje jako polydisperzní index (PDI). Povrchový náboj je nejčastěji analyzován zeta potencionálem. Velikost částic lze taktéž vyhodnotit pomocí mikroskopických technik, jako transmisní elektronová mikroskopie (TEM) nebo skenovací elektronová mikroskopie (SEM). (Khan et al., 2019).

Hydrodynamický rozptyl světla

Při charakterizaci biopolymerních nanočástic existuje několik parametrů, které přímo ovlivňují stabilitu koloidních suspenzí. DLS je běžná metoda používaná k měření velikosti částic v nanometrovém a submikronovém rozsahu v kapalném prostředí. Princip metody je založen na měření fluktuace intenzity rozptýleného světla, které je rozptýleno pohybujícími se molekulami nebo částicemi ve vzorku. Částice se v roztoku neustále a náhodně pohybují, tento jev se nazývá Brownův pohyb. Technika dynamického rozptylu světla využívá laser, který dopadá na povrch částic. Rychlost Brownova pohybu, nebo také intenzity rozptylu světla, udává velikost částic. Čím je rychlost a intenzita nižší, tím jsou částice větší a naopak (Lin et al., 2022).

Polydisperzní index

Hydrodynamický rozptyl světla s polydisperzním indexem úzce souvisí, protože PDI měří šíři distribuce velikosti částic změřených pomocí DLS. Jinak řečeno, PDI udává, jak jsou dané částice oproti sobě velikostně rozdílné. Polydisperzní index je bezrozměrná veličina, jeho číselná hodnota se pohybuje od 0 (pro velikostně uniformní částice ve vzorku) do 1 (pro

velikostně heterogenní částice ve vzorku). Homogenní suspenze částic chitosanu je udáváno do 0,3 PDI (Chae et al., 2018). Nad tuto hodnotu začínají být částice polydisperzní. Míra distribuce nad 0,7 PDI značí zcela nehomogenní a agregovaný vzorek (Danaei et al., 2018).

Zeta potenciál

Zeta potenciál hraje klíčovou roli při hodnocení stability koloidních suspenzních roztoků. Poskytuje informace o elektrostatických vlastnostech částic a jejich interakci s okolním prostředím. Vysoce kladně nebo záporně nabitě částice mají tendenci se navzájem odpuzovat, čímž tvoří stabilní koloidní roztoky. Náboj vzniká díky adsorpci iontů z okolního roztoku, disociaci funkčních skupin na povrchu částic nebo jinými procesy. Obecně se za stabilní považují koloidy s hodnotami zeta potenciálu v rozmezí -30 až $+30$ mV nebo vyšší. Na druhé straně zeta potenciál nižší než -30 až $+30$ mV má tendenci tvořit agregáty a tím snížit jejich stabilitu. Za těchto podmínek nejsou částice vhodné k testování (s ohledem na homogenost vzorku) *in vitro* nebo *in vivo* (Carrasco-Sandoval et al., 2023). Hodnoty zeta potenciálu jsou nejvíce ovlivňovány koncentrací chitosanu, pH roztoku, molekulovou hmotností nebo rychlostí míchání částic při přípravě (Oudih et al., 2023).

2.2.4 Stabilita chitosanových částic v kultivačních médiích

Stabilita chitosanových částic v kultivačních médiích je klíčovým parametrem pro jejich biologickou funkčnost a spolehlivost výsledků *in vitro* studií. Kultivační média, jako jsou DMEM, RPMI nebo MEM, obsahují komplexní směsi iontů, proteinů, glukózy, aminokyselin a dalších biomolekul, které mohou významně ovlivnit elektrostatické vlastnosti, velikost a morfologii částic. Jedním z hlavních mechanismů ovlivňujících stabilitu částic v těchto médiích je tvorba proteinové korony. Ta vzniká adsorpcí sérových proteinů (např. albumin, imunoglobuliny, komplementové faktory) na povrch nanočástic (Strojan et al., 2017). Jak ukázaly studie Strojan et al., složení této korony není univerzální – závisí na povrchových vlastnostech částic, složení média a koncentraci proteinů. Proteinová korona mění zeta potenciál částic a může vést k jejich agregaci či změně vnitrobuněčného transportu (Strojan et al., 2017).

Meesaragandla et al. potvrdili, že přítomnost fetálního bovinního séra (FBS) v RPMI médiu zhoršuje stabilitu chitosanem funkcionalizovaných zlatých nanočástic, přičemž pozorovali vznik sférických i nesférických agregátů a vyšší produkci ROS. V prostředí bez FBS

byly částice stabilnější a méně cytotoxické. Naopak v přítomnosti sérových proteinů dochází k výrazné destabilizaci a změně chování částic (Meesaragandla et al., 2022).

Podobně Ozturk et al. potvrdili, že CS/TPP mikročástice byly výrazně náchylné k agregaci v médiu RPMI s obsahem fetálního bovinního séra. Zeta potenciál se snížil z $+40 \pm 5$ mV na -5 mV a částice dosahovaly velikosti až 10 μ m. Autoři uvádějí, že mikročástice v RPMI bez FBS byly relativně stabilní, i když časová závislost hrála významnou roli, zejména při inkubaci při laboratorní teplotě 25 °C a v inkubátoru o teplotě 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. Chitosanové mikročástice skladovány při 4 °C po dobu 24 a 48 hodinách v RPMI bez séra nepodléhaly významné agregaci. Autoři doporučují omezit dobu expozice buněk chitosanovými nanočásticemi na maximálně 6 hodin, po níž by mělo následovat důkladné promytí buněk fosfátovým pufrům (PBS). Tento postup minimalizuje riziko zkreslení výsledků cytotoxicity, zejména při použití kolorimetrických testů na bázi tetrazoliových solí (Ozturk et al., 2020).

Významná data poskytuje i studie Jesus et al., která se zabývala vlivem stupně deacetylace na stabilitu chitosanových nanočástic (CSNP 80% a CSNP 93%) v médiích DMEM a RPMI. Během 24 hodin inkubace těchto částic v médiích došlo ke snížení zeta potenciálu z původních +20 mV pro CSNP 93% a +29 mV pro CSNP 80% na -4 mV (CSNP 93%) a -5 mV (CSNP 80%) v DMEM a v RPMI na $-2,1$ mV (CSNP 80%) a $-4,4$ mV (CSNP 93%). Zároveň došlo k zvýšení polydisperzního indexu z 0,3 (CSNP 80%) na 0,75 a z 0,2 (CSNP 93%) na 0,5 v DMEM po 1 hodině, po 24 hodinách se PI lehce zvýšilo u obou chitosanů. V médiu RPMI PI CSNP 80% dosahovalo na hodnotu 0,5 po hodině a 24 hodinách, pro CSNP 93% PI až na hodnotu 0,9 po 1 hodině. Zmíněné číselné hodnoty svědčí o významné agregaci a destabilizaci chitosanových mikročástic v kultivačních médiích. Stabilita částic byla výrazně vyšší ve vodě než v komplexních buněčných médiích. Autoři zároveň uvádějí, že míra deacetylace chitosanu má významný vliv – vyšší stupeň DD přináší větší stabilitu a nižší cytotoxicitu (Jesus et al., 2020).

Zajímavé poznatky přináší i studie Groza et al., která se zaměřila na kompozitní bioaktivní vrstvy tvořené chitosanem a hydroxyapatitem modifikovaným hořčíkem. Tyto vrstvy byly ozářeny elektronovým svazkem a následně inkubovány v médiu RPMI po dobu 7 a 14 dní. Výsledky ukázaly, že během inkubace došlo k absorpci složek média do struktury vrstev, což vedlo k tvorbě karbonátového hydroxyapatitu typu B a ke změně morfologie povrchu, kde vznikly nano- a mikrosférické struktury. Po 14 dnech byla viabilita buněk

osteoblastů MG63 až 106 %. Kultivační médium pozitivně ovlivnilo chování bioaktivních vrstev z chitosanu a hydroxyapatitu, přestože došlo k chemickým a povrchovým změnám (Groza et al., 2025).

Cai a Lapitsky ve své studii testovali vliv biomolekul na stabilitu CS/TPP částic. Zjistili, že běžné proteiny jako BSA nebo α -laktalbumin nejsou schopny zlepšit stabilitu částic v solném prostředí (PBS). Tyto proteiny se váží k chitosanu slabě a rychle se z částic uvolňují. Naopak DNA, jakožto záporně nabitý polyaniont, je silně vázán na kladně nabitý chitosan a může zvýšit stabilitu částic tím, že brání jejich úplnému rozpadu ve fyziologickém prostředí. Stabilizační účinek DNA byl však závislý na koncentraci – při nadbytku DNA docházelo k precipitaci a tvorbě agregátů. Výsledky studie ukazují, že negativně nabitě biomolekuly mohou hrát roli v stabilizaci, ale jejich použití je potřeba optimalizovat (Cai et Lapitsky, 2020).

2.2.5 Internalizace chitosanových materiálů do buněk

Chitosanové materiály mají významné postavení v oblasti cíleného doručování léčiv. Klíčovým předpokladem pro jejich účinnost je schopnost pronikat do buněk a transportovat terapeutické látky do intracelulárních kompartmentů. Pro efektivní doručování chitosanových materiálů do buněk je nezbytné porozumět nejen jejich stabilitě v biologickém prostředí, ale také způsobu, jakým interagují s buněčnými strukturami (Pathak et al., 2023). Tato kapitola se zaměřuje na faktory ovlivňující míru jejich internalizace a mechanismy buněčného vstupu.

Uvádí se, že částice menší velikosti se inkorporují do buněk ve větší míře oproti větším (Parde-Schrepler et al., 2017). Tamann et al. připravili chitosanové nanočástice (25 nm), které vykazovaly efektivnější intracelulární transport než mikročástice o velikosti 150 nm. Autoři uvádějí, že nanočástice o velikosti 25 nm lépe pronikaly do jádra buněk, navzdory snížené schopnosti vázat účinnou látku (Tamann et al., 2015). Cytoplazmatická membrána nese na svém povrchu negativní náboj. Chitosanové materiály s kladným povrchovým nábojem jsou elektrostaticky přitahovány negativně nabitou buněčnou membránou, což podporuje jejich adsorpci na buněčný povrch a usnadňuje iniciaci endocytózy. Výsledkem bývá výrazně vyšší buněčný příjem ve srovnání s neutrálními nebo zápornými náboji. Například Dyawanapelly et al. porovnávali PLGA nanočástice s negativním nábojem a tytéž částice potažené chitosanem (Dyawanapelly et al., 2016). Modifikace povrchů chitosanových materiálů hraje klíčovou roli v udržení jejich stability v biologickém prostředí, přináší efektivnější buněčnou internalizaci a zajištění selektivního cílení v rámci léčebných aplikací. Chemické složení povrchu částic lze

cíleně upravit prostřednictvím ligandů, povrchovou funkcionalizaci polymery nebo funkčních skupin. Jednou z běžně využívaných strategií je funkcionalizace chitosanových materiálů cílenými ligandy, které umožňují receptorově zprostředkovanou endocytózu. Například Pereira et al. prokázali, že konjugace folátu na povrchu chitosanového hydrogelu vykazoval významně vyšší míru internalizace u buněk s vysokou expresí folátového receptoru oproti hydrogelu bez folátového ligandu (Pereira et al., 2015). Pro snížení interakce mezi chitosanovými materiály a plazmatickými proteiny nebo buňkami imunitního systému, je využívána modifikace povrchu pomocí syntetického polymeru PEG neboli PEGylace (Tammam et al., 2015). Za účelem zvýšení mukoadhezivních vlastností chitosanových materiálů se využívají jejich thiolované deriváty, které vykazují vyšší afinitu k buněčným membránám či slizničnímu epitelu a prodlužují dobu kontaktu s cílovou tkání (Yu et al., 2017).

Endocytóza je aktivní transportní mechanismus, kterým buňka přijímá látky z extracelulárního prostředí pomocí invaginace plazmatické membrány a vytvoření intracelulárních vezikul. Dělí se na dvě kategorie: pinocytóza a fagocytóza. Pinocytóza se dále dělí na: klatrin-dependentní endocytózu, kaveolin-dependentní endocytózu a makropinocytózu (Pathak et al., 2023). Klatrin-dependentní endocytóza neboli receptorem zprostředkovaná endocytóza je nejvíce prostudovaný mechanismus internalizace v eukaryotních buňkách. Tento proces začíná vazbou extracelulární molekuly (ligandu) na specifický membránový receptor, což indukuje akumulaci adaptinových proteinů a polymeraci klatrinu – trojného strukturálního proteinu. Klatrin vytváří charakteristickou polyedrickou „klec“ na cytoplazmatické straně plazmatické membrány. Tato klatrinová síť zajišťuje mechanickou stabilitu a prostorovou organizaci vznikající endocytické vezikuly o velikosti přibližně 100–250 nm. Následně je vezikula odškrcena od membrány pomocí GTPázy dynaminu a transportována do cytoplazmy, kde fúzuje s časnými endozomy (Pereira et al., 2015). Tato forma endocytózy je energeticky náročná, selektivní a regulovaná, což ji činí klíčovým mechanismem pro kontrolovaný příjem živin, růstových faktorů a také terapeutických nano-, mikročástic. U chitosanových mikročástic byla klatrin-dependentní internalizace prokázána v řadě studií, např. v Jiang a kol. nebo Cui a kol. (Jiang et al., 2017, Cui et al., 2020). Endocytóza zprostředkovaná kaveolinem je druh endocytózy, která využívá kaveoly, membránové invaginace připomínající baňky o velikosti přibližně 50–80 nm. Jsou bohaté na cholesterol, sfingolipidy a strukturální protein caveolin-1. Tento typ endocytózy je typický pro buňky bohaté na kaveoly, např. endotelové buňky, adipocyty, fibroblasty a svalové buňky

(Lima et al., 2021). Naproti tomu v buněčné linii A549 byla internalizace kaveolinem zprostředkována v menší míře (Huang et al., 2002). Při makropinocytóze buněčná membrána vytváří široké výběžky (tzv. ruffles), které pohlcují extracelulární tekutinu a částice do velkých váčků (0,2–5 μm) zvaných makropinozomy, které splývají s lysozomem. Jedná se o neselektivní endocytózu, která není receptorově řízená, ale kde dochází k polymerizaci aktinu v cytoskeletu, čímž vznikají membránové (aktinové) výběžky. V studii Dou et al. testovali mechanismus internalizace chitosanem potažené PLGA mikročástice. Zjistili, že mikročástice o velikosti 532 nm byly pohlceny procesem makropinocytózy, přičemž mikročástice PLGA bez chitosanu (472 nm) inkorporovány makropinocytózou nebyly. Autoři tento rozdíl vysvětlují tak, že mikročástice s chitosanem měly kladný povrchový náboj a výrazně adherovaly k povrchu buněk, čímž podpořily vznik membránových výběžků a iniciovaly proces makropinocytózy (Dou et al., 2019). Fagocytóza je endocytární proces, jehož prostřednictvím profesionální fagocyty imunitního systému (makrofágy, monocyty, neutrofilny a dendritické buňky) pohlcují velké částice ($> 0,5 \mu\text{m}$) jako jsou apoptotická tělíska nebo patogeny. Receptory na povrchu fagocytu se po navázání objektu shlukují a iniciují polymeraci aktinu, která vede k vytváření panožek (pseudopodií) obklopujících částici. Následně membrána splývá a uzavírá částici do velkého vezikulu zvaného fagozom, ten splyne s lysozomem a vytvoří fagolysozom, kde jsou pohlcené objekty enzymaticky rozloženy (Pathak et al., 2023). V práci Jiang et al. se zabývali internalizací chitosanových mikročástic makrofágy RAW 264.7. Z výsledků jejich studie, autoři zjistili, že mikročástice o velikosti $246 \pm 17 \text{ nm}$ byly buňkou pohlcovány nejen prostřednictvím klatrinu, ale z menší části také fagocytózou. Je zřejmé, že makrofágy mohou pohlcovat i objekty menší než 500 nm (Jiang et al., 2017).

2.3 Výzkum a vývoj chitosanových materiálů v biomedicíně

Chitosanové materiály jsou aktuálně vyvíjeny v oblastech systémů doručování léčiv. Jsou připravovány ve formách částic (nano-, mikro-), vláken, tenkých filmů nebo hydrogelů a zároveň jako deriváty chitosanu (karboxymethylchitosan, trimethylchitosan atp.). Níže jsou uvedeny odvětví medicíny a několik příkladů chitosanových materiálů studovaných *in vitro* a *in vivo* jako potenciální nástroje v moderním pojetí léčby nebo diagnostiky. Jedná se o systém doručování léčiv v oblasti intranasálního podání léčiv a vakcín na bázi chitosanových nanočástic, dále chitosanové materiály v oblasti léčby a diagnostiky nádorových onemocnění, genová terapie s využitím chitosanových částic, hojení ran pomocí chitosanových hydrogelů

nebo využití chitosanových materiálů v oblasti tkáňového inženýrství. Co se týče hojení ran, v současné době jsou na trhu hemostatické obvazy na bázi chitosanu pod obchodními názvy ChitoGauze® a HemCon®.

2.3.1 Systémy doručování léčiv

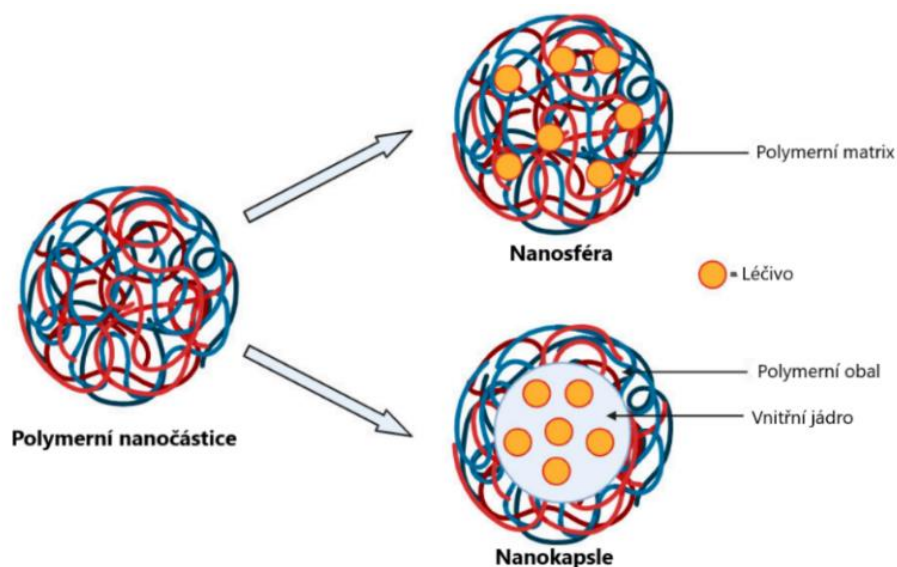
Systém doručování léčiv je proces, který funguje na principu transportu léčivé látky na požadované místo účinku v těle. Cílem je zvýšit účinnost léčby, minimalizovat vedlejší účinky a zlepšit komfort pacienta. Většina léčiv je konvenčně podávána ve formách tablet, kapslí, injekcí, masť nebo sirupů. Tyto formulace uvolňují léčivo systémově do krevního řečiště (vyjímaje masti), což vede k širší distribuci látky v těle. Mezi nejobvyklejší aplikace léčiv jsou perorální, lokální, transmukózní, parenterální a inhalační cesta (Jaferník et al., 2023). Tyto konvenční přístupy mají určitá omezení, která mohou snížit účinnost léčiv. Omezení zahrnují sníženou absorpci léčiva, jeho nekontrolované uvolňování, nevyžádanou enzymatickou degradaci nebo vedlejší účinky, s níž se pojí toxicita na molekulové až orgánové úrovni (Ye et al., 2018).

V moderní medicíně a farmacii je kladen důraz na výzkum a podávání léčiv s cíleným dodáním na určené místo v organismu. Prostřednictvím cíleného dodávání léčiva a řízeného uvolňování se snižuje toxicita (nežádoucí účinky), dávkování a frekvence podávání látky (Ye et al., 2018). Zvýšená akumulace terapeutik v postižených oblastech přispívá ke snížení systémové toxicity léčiv tím, že omezuje expozici zdravých tkání a zároveň zvyšuje účinnost léčby. Transport léčiv lze klasifikovat do dvou kategorií: aktivní a pasivní (Zhang et al., 2019).

K vlastnostem cíleného transportu léčiv patří kontrolovatelné uvolňování nesoucí látky závislé na fyzikálně-chemických aspektech. Chitosan je nerozpustný v zásaditých a neutrálních pH roztocích. V kyselém prostředí je rozpustný, částice se začnou rozpadat a uvolňovat léčivo. Takové prostředí je typické pro nádory, prostředí žaludku nebo endozomy a lysozomy v buňkách (Abbasi et al., 2024). Kombinace chitosanu s materiály citlivými na vnější podněty, jako je světlo, teplota nebo magnetické pole, umožňuje spouštět kontrolované uvolňování léčiva v cílové oblasti (Sathiyaseelan et al., 2022). Léčiva mohou být z chitosanových nosičů uvolňována difúzí, kterou ovlivňuje velikost pórů a koncentrace léčiva. U nosičů s vyšší porozitou dochází k rychlejšímu uvolnění, zatímco hustší struktury umožňují prodloužené a kontrolované uvolňování (Li et al., 2021). Na základě výše uvedených informací mohou být léčiva uvolňována difúzí: změnou pH nebo pomocí stimulačně-responzivního uvolňování.

Ideální nosič léčiv by měl být tedy schopen chránit aktivní sloučeninu v léčivech proti degradaci imunitním systémem a podporovat vychytávání buňkami prezentujícími antigen. Umožňovat efektivní transport účinných látek do cílových tkání a zajišťovat jejich postupné uvolňování (Dabaghian et al.,2018). Pro tento účel bylo vyvinuto několik typů nanočástic včetně organických (chitosan, celulóza, lipozomy), anorganických (kovové, oxidy kovů, křemíkové nanočástice) (Far et al.,2024) a biologických částic (exozomy, adenoviry, albumin) (Luo et al., 2023). Chitosan, disponující kladným nábojem a mukoadhezivní vlastností, pomáhá prodloužit střední dobu setrvání částic přilnutím k záporně nabitě buněčné membráně. Pro jeho další vlastnosti, zejména biokompatibilitu a netoxicitu, je jeden z nejpoužívanějších přírodních polymerů v nosičových systémech (Chauhan et al.,2024).

Chitosanové nanočástice (1–100 nm) a mikročástice (100 nm–100 μ m) jsou široce používány ve farmaceutických výzkumných aplikacích především jako nosiče léčiv. Nano- a mikročástice snadno pronikají kapilárními a epiteliálními tkáněmi, čímž umožňují účinně dodávat účinné látky, jako jsou léky, vakcíny nebo genetický materiál do cílových míst v těle. Mikročástice oproti nanočásticím pronikají do buněk a tkání pomaleji, na druhou stranu jsou vhodnými nosiči pro dlouhodobé uvolňování léčiv. Nanočástice do velikosti 100 nm vykazovaly více než trojnásobně vyšší míru distribuce do arteriálního řečiště ve srovnání s mikročásticemi o velikosti 275 nm (de Pinho Neves et al., 2014). Nanočástice a mikročástice se připravují ve formě sfér nebo kapslí (mikro- nanosféra/mikro- nanokapsle). Sférické částice jsou tvořeny materiálem (například polymerem), ve kterém může být aktivní látka rovnoměrně rozptýlena nebo navázána na jejím povrchu. Kapsle mají dutou strukturu rozdělenou vnitřním jádrem a vnějším membránovým obalem. Účinná látka může být uzavřena uvnitř kapsle (v jádře), nebo ve stěně obalu (Victor et al., 2024). Nanosféry a nanokapsle jsou schematicky znázorněny na obr. č. 6.



Obrázek 6: Nanosféra a nanokapsle, převzato a upraveno podle Victor et al., 2024.

Chitosanové a jiné hydrogely vznikají zesíťováním polymerních řetězců vedoucím k trojrozměrným (3D) strukturám schopným zadržovat velké množství vody bez následného rozpouštění. Poddajná struktura chitosanu s vysokým obsahem vody činí hydrogely ideálním materiálem pro tkáňové inženýrství, zejména jako skafoldy v regenerativní medicíně či při vývoji implantátů. Tento potenciál podněcuje rostoucí zájem o hydrogely vyráběné pomocí 3D tisku. Chitosanové hydrogely mají širokou škálu aplikací v biomedicínské oblasti, jako je krytí ran nebo systém dodávání léčiv (Maiz-Fernández et al., 2021).

Vláknina chitosanu vykazují vysoký poměr plochy povrchu k objemu, což je činí biokompatibilními pro podporu buněčné adheze a růstu. Jsou porézní a vykazují vysokou mechanickou pevnost v tahu. Skládáním vláken různých velikostí (nano- /mikro-) vznikají chitosanové membrány. Porozita vláknitých membrán usnadňuje transport živin a odstranění metabolického odpadu. Vláknité membrány svou strukturou připomínají extracelulární matici, což je činí vhodné v tkáňovém inženýrství a hojení ran (Tao et al., 2020).

Tenké chitosanové filmy jsou homogenní, polopropustné vrstvy zajišťující mechanickou stabilitu vysokou pevností a pružností (Xu et al., 2022). Umožňují difúzi kyslíku, což je žádoucí v aplikacích pro hojení ran, nebo poskytují ochranu před dehydratací a vnější kontaminací (Jamaran et al., 2022).

Výzkum léčiv na bázi chitosanových nanočástic k intranazálnímu podání

Léky podávané per os se potýkají s celou řadou překážek, a tyto bariéry zahrnují náchylnost k degradaci léčiva v gastrointestinálním traktu a jaterním metabolismu. To vede ke snížené systémové absorpci a nedostatečným koncentracím léčiva v cílovém místě. Vstupní nosní cesta představuje neinvazivní, bezbolestnou a patientsky přívětivou alternativu k tradičním způsobům aplikace léčiv. Je považováno za bezpečné nejen díky nízkému riziku infekce a možnosti samoaplikace, ale také z hlediska toxicity – vhodně navržené formulace nepoškozují nosní sliznici, nevykazují lokální ani systémové toxické účinky a využívají biokompatibilní nosné systémy. Nosní sliznice je díky své vysoké vaskularizaci vhodná pro rychlou a účinnou absorpci léčiv. Obsahuje imunitní bariéru známou jako NALT, která je součástí slizniční lymfoidní tkáně MALT (Dumkliang et al. 2021) Přítomnost této obranné struktury však komplikuje nazální podání vakcín, protože volně rozpustné antigeny často nedokážou vyvolat dostatečnou imunitní odpověď bez použití adjuvans nebo vhodných nosičových systémů. Tyto systémy a pomocné látky zajišťují delší kontakt antigenu se sliznicí, jeho transport přes epitel a následnou aktivaci buněk imunitního systému (Dabaghian et al., 2018, Dumkliang et al. 2021).

Kationtová povaha chitosanu otevírá těsná spojení hematoencefalické bariéry (BBB) dvěma cestami: extracelulární cestou a intracelulárními, což umožňuje lékům procházet skrze BBB. Mukoadhezivita chitosanu zvyšuje retenční čas na sliznici a následně zvyšuje jeho absorpci, a tím účinnost léčby. Jakožto adjuvans zvyšuje rozpustnost hydrofobních léčiv. Obvykle jsou léky na poruchy CNS preferovány pro podávání perorálně. Intranazální podání zlepšují průnik léku do mozku a zkracují systémovou expozici. Tento fakt potvrdili i Liu et al., kteří vyvinuli karboxymethylchitosanové nanočástice s obsahem karbamazepinu pro intranazální podání k léčbě epilepsie. Z výsledku jejich studie uvedli, že tyto nanočástice účinně penetrovaly přes BBB a pozvolna uvolňovaly karbamazepin s výraznou absorpcí. Intranazální podání je se jeví účinnějším oproti konvenčnímu intravenóznímu a orálnímu podání (Liu et al., 2018).

Podobně Hassan et al. připravili lipidové nanočástice funkcionalizované chitosanem s obsahem Tanshinone IIA. Tanshinone IIA je lipofilní diterpen extrahovaný z kořenů čínské byliny zvané *Salvia miltiorrhiza*. Bylina vykazuje různé biologické účinky proti mnoha lidským onemocněním zahrnujícím neurologické poruchy, zejména Parkinsonovy choroby. Zároveň zjistili, že zkoumaná látka disponuje antidepresivními a protizánětlivými účinky.

Připravené částice obsahující *Salvia miltiorrhiza* se jeví jako dobré léčivo pro Parkinsonovu chorobu (Hassan et al., 2024).

Ve studii Alastal et al. enkapsulovali dihydroergotamin do nanočástic z chitosanu a podávali je intranazálně laboratorním krysám. Z výsledků vyplývá, že se významně zvýšila účinnost dihydroergotaminu oproti standardním intranazálním roztokům. Léčivo přenášené pomocí nanočástic z chitosanu se jeví jako slibný lék pro akutní léčbu migrény (Alastan et al., 2023).

Hassan et al. připravili a hodnotili nasální podání antihypertetika olmesartan medoxomil enkapsulovaný v mikročásticích chitosanu. Při perorálním užívání je biologická dostupnost antihypertetika nízká, zároveň se objevuje průjem jako vedlejší účinek v důsledku imunitní odpovědi na lék. Z experimentu na laboratorních krysách zjistili, že antihypertetikum zapouzdřené v chitosanových mikročásticích podávané intravazálně zvýšilo 11krát biologickou dostupnost a 7,2krát střední retenční čas, oproti perorálnímu užívání. Zároveň laboratorní krysy vykazovaly pokles krevního tlaku ve srovnání s kontrolní skupinou krys a snížení vedlejších účinků (Hassan et al., 2022).

Experimentální vakcinace nanočásticemi chitosanu k intranasálnímu podání

Iswanti et al. ve své studii uvedli, že nanoformulace chitosanu indukuje imunitní odpověď po nazálním podání. Chitosan díky své mukoadhezivní schopnosti napomáhá kontaktu s nosní sliznicí a podporuje průnik do tkáně tím, že snižuje účinnost mukociliární clearance. Při transportu antigenu zároveň usnadňuje otevření těsných spojení nosní epitelové bariéry (Iswanti et al., 2019). Zároveň bylo zjištěno, že nosní podání léčiv má vyšší účinnost oproti konvenčnímu subkutánnímu podání (Amirnasr et al., 2016).

Navzdory těmto slibným vlastnostem není nativní chitosan při fyziologickém pH dostatečně funkční jako nosič ani adjuvans, což omezuje jeho využití v nosních vakcínách. Proto je často chemicky modifikován na deriváty, jako je trimethylchitosan, který si zachovává rozpustnost a stabilitu i v neutrálním pH. Interaguje s mucinem a zvyšuje setrvání antigenu na sliznici, čímž podporuje vznik protilátkové odpovědi. Intranasální transport chitosanu je využíván při léčbě i prevenci různých patologických stavů, jako vakcinace proti chřipce, bakteriálnímu onemocnění a jiné. Studie Dabaghian et al. popisuje přípravu částic na bázi TMC k vakcinaci proti chřipce A (Dabaghian et al., 2018). Najminejad et al. zkoumali účinnost vakcinace na bázi trimethylchitosanu proti černému kašli (Najminejad et al., 2019). Nevagi

et al. zas připravili nanovakcínu s peptidem polyglutamové kyseliny a TMC. Vakcína vyvolala u myši silné systémové a slizniční protilátkové reakce proti *Streptococcus* skupiny A (Nevagi et al., 2018).

Dumkliang et al. se zaměřili na vývoj vakcíny proti Japonské encefalitidě. Nanočástice z chitosanu proti Japonské encefalitidě prokázaly zvýšené slizniční imunitní reakce a vyšší hladiny sekrečního imunoglobulinu A ve srovnání s tradiční subkutánní imunizací. Výsledky ukazují na potenciál posílení slizniční i systémové imunity proti Japonské encefalitidě (Dumkliang et al. 2021). Alcantara et al. vyvinuli účinný mukoadhezivní chitosanový nosič se zapouzdřeným favipiravirem. Favipiravir je antivirotikum pro léčbu mírných až středně závažných případů koronavirového onemocnění COVID-19. Chitosanové nanočástice s optimalizovanými vlastnostmi s enkapsulovaným favipiravirem vykazovaly až 35krát vyšší inhibici virové replikace ve srovnání s volně podaným favipiravirem intranasálně. Toto zjištění ukazuje na zásadní význam vhodné formulace nosiče pro zvýšení terapeutické účinnosti (Alcantara et al., 2022).

Gastroenteritické infekce brucelóza, vyvolaná bakterií *Brucella abortus*, způsobuje nakažlivou zoonózu a chronicitu onemocnění u lidí. Shim et al. připravili nanočástice chitosanu, do kterých byl zapouzdřen enzym malátdehydrogenáza. Ten sloužil jako imunogenní antigen. Po podání laboratorním myším navodil slizniční imunitní odpověď skrze NALT, indukoval produkci prozánětlivých cytokinů a specifického imunoglobulinu A, což poukazuje na potenciál silné imunitní reakce (Shim et al., 2020).

Chitosanové materiály v experimentální léčbě a diagnostice nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění se řadí mezi celosvětově druhou nejčastější civilizační chorobu na světě, první z nich jsou nemoci kardiovaskulárního systému. Podle světové zdravotnické organizace WHO v roce 2018 zemřelo na toto onemocnění odhadem 9,6 milionů lidí. Nádory plic, prostaty, tlustého střeva, konečníku, žaludku a jater jsou nejčastějšími typy neoplasií u mužů. Zatímco novotvary prsu, tlustého střeva, konečníku, plic, děložního čípku a štítné žlázy jsou nejčastější u žen (WHO, 2025).

Konvenční chemoterapie se systémovým podáváním cytostatik vede k nežádoucímu ovlivnění zdravých buněk, ke špatné léčbě a rozvoji rezistence vůči antineoplastickým lékům (Zhang et al., 2019.). Mnohočetná léková rezistence je často se vyskytující fenomén v terapii nádorových onemocnění. Nádorové buňky získávají odolnost vůči širokému spektru

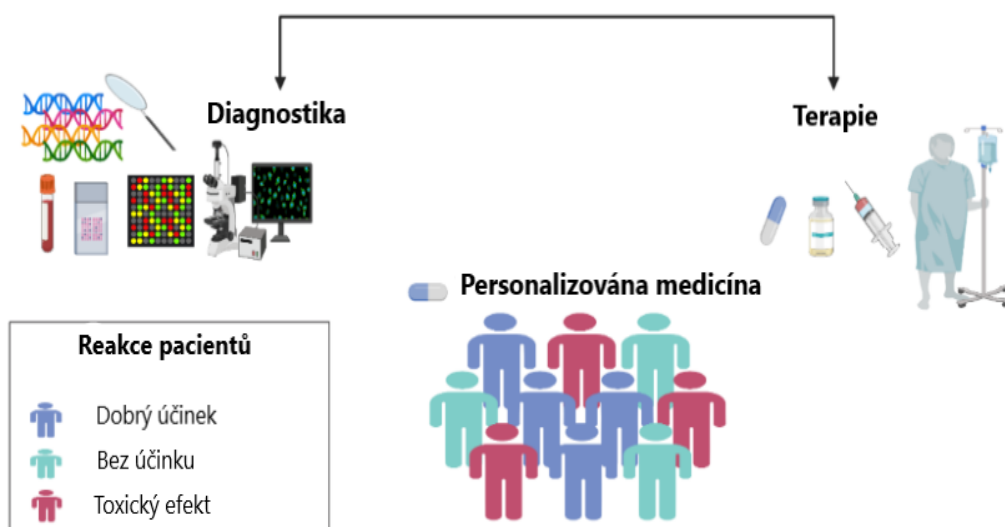
chemoterapeutických léčiv, včetně těch, se kterými nebyly původně léčeny. Léková rezistence je jedna z hlavních příčin komplikací a selhání chemoterapie (Nurjis et al., 2024).

Cévní řečiště solidních nádorů roste nekontrolovatelně rychle, nerovnoměrně, podléhá tvorbě větších uzlů a pórů. Nádorové cévy jsou často nezralé, nepravidelné a mají větší póry než neporušené. Prostřednictvím těchto pórů mohou částice pronikat dovnitř nádoru. Mimo jiné, lymfatický systém nedokáže z nádorové tkáně efektivně odstraňovat živiny a odpadní materiály. Kombinací těchto dvou anomálií vzniká fenomén EPR (zvýšená propustnost a retence). Díky porušenému a poréznímu cévnímu spojení částice a nanočástice snadněji pronikají do nádoru a kvůli nedostatečnému lymfatickému systému tam zůstávají delší dobu. Tento mechanismus představuje pasivní transport solidních nádorů (Zhang et al., 2019).

Snížit lékovou rezistenci pomocí pasivního transportu se pokoušeli ve studii Nurjis et al., kteří připravili a testovali nanomicely na bázi kvartérního amonného palmitoylového glykol-chitosanu s kombinací doxorubicinu a kurkuminu. Tento systém byl určen k překonání mnohočetné lékové rezistence v léčbě trojitě negativního karcinomu prsu. Z výsledků jejich studie se ukázalo, že nanomicely vůči nádorovým buňkám vykazovaly vyšší absorpci, toxicitu a apoptózu oproti volným léčivům doxorubicinu a kurkuminu. Zároveň bylo prokázáno snížení nežádoucích účinků zapouzdřeného doxorubicinu v nanomicelích. Tento léčebný přístup může zmírnit mnohočetnou lékovou rezistenci, podporovat synergický efekt obou léčiv a nabídnout bezpečnější alternativu ke standardní chemoterapii (Nurjis et al., 2024). Ve studii Zhang et al. bylo snížení lékové rezistence dosaženo kombinací radionuklidové a fotodynamické terapie. Radionuklidová terapie pomocí nanočástic značených radionuklidem lutecium-177 způsobila přímé poškození DNA nádorových buněk, zatímco fotodynamická terapie zvýšila produkci ROS, které způsobily oxidativní stres a dodatečné poškození buněčných struktur. Díky tomu bylo možné překonat obranné mechanismy nádorových buněk a výrazně zvýšit účinnost léčby. Navíc změna povrchového náboje nanočástic na bázi glykol-chitosanu v kyselém nádorovém mikroprostředí vedla k vyšší buněčné internalizaci, zvýšené produkci ROS a synergickému cytotoxickému účinku, což umožnilo efektivní eliminaci i potenciálně rezistentních nádorových buněk (Zhang et al., 2022).

Aktivní transport je založen na interakci mezi buněčnými receptory nádoru a specifickou protilátkou navázanou na komplexu léčiva a částicového nosiče pomocí kovalentních vazeb nebo tzv. spaceru. Dochází tak ke specifické reakci mezi receptorem a léčivem pomocí vazebné afinity protilátky (Zhang et al., 2019). V medicíně je zaveden

relativně nový termín zvaný „teranostika“, který vznikl se spojením slov „**terapie**“ a „**diagnostika**“. Kombinuje diagnostickou složku umožňující detekci, lokalizaci a monitorování nádoru. Terapeutická složka umožňuje cíleně dodávat léčivo přímo do nádorové tkáně, čímž zamezuje poškození zdravých buněk. Teranostika, vycházející z personalizované medicíny, vytváří léčbu „na míru“ na základě detailního popisu nádorového onemocnění s využitím genetických vyšetření (Alghamdi et al., 2022). Obr. č. 7 schématicky znázorňuje teranostickou léčbu.



Obrázek 7: Teranostika, převzato a upraveno podle Alghamdi et al., 2022.

U většiny nádorových buněk dochází k nadměrné expresi specifických receptorů na jejich povrchu, které se liší od zdravých buněk. Tyto receptory (např. folátový receptor alfa) jsou charakteristické pro určité typy nádorů a poskytují příležitost pro cílenou terapii. Strategie využívající ligandy (např. kyselina listová) umožňují přesné doručení léčiv k nádorovým buňkám, čímž se zvyšuje účinnost léčby a snižují se vedlejší účinky na zdravé tkáně. Ye et al. připravili nanočástice chitosanu se zapouzdřeným doxorubicinem a navázanou kyselinou listovou, která slouží jako cílově selektivní ligand pro folátový receptor exprimovaný na buňkách hepatomu. Porovnávali cytotoxicitu doxorubicinu zapouzdřeného do nanočástic chitosanu bez ligandu a s ligandem. Došli k závěru, že nanočástice s navázanou kyselinou listovou prokázaly výrazně vyšší cytotoxicitu vůči buňkám hepatomu, což vedlo ke snížené proliferaci buněk oproti nanočástic bez ní. Dále bylo zjištěno, že vazebná afinita mezi ligandem

a buněčným receptorem zvýšila inkorporaci částic prostřednictvím endocytózy (Ye et al., 2018).

Podobně ve své studii Hemalatha et al. cílili na folátové receptory nádorových buněk, kdy vyrobili anhydridové nanočástice oxidu železa a zlata, potažené oleyl-chitosanem s konjugovaným methotrexátem. Methotrexát zde plnil dvojí roli, jako terapeutická složka inhibující dihydrofolátreduktázu, a současně jako cílený ligand umožňující specifickou vazebnou afinitu na folátové receptory na povrchu nádorových buněk. Diagnostická funkce systému byla zajištěna kombinací magnetických vlastností železa, které umožňovalo negativní kontrast v magnetické rezonanci (MRI), a vysoké rentgenové absorpce zlata pro účinné zobrazení pomocí počítačové tomografie (CT). Nanočástice vykazovaly vynikající biokompatibilitu, minimální toxicitu a vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti pro využití v teranostice, tedy v souběžné terapii a zobrazovací diagnostice nádorových onemocnění (Hemalatha et al., 2018).

Pro zobrazovací diagnostiku nádorové tkáně, v práci Vashist et al., byly vyvinuty biopolymerní nano- a mikrogely na bázi chitosanu a hydroxyethylcelulózy, které byly hydrofobně modifikovány polyolem získaným z lněného oleje. Díky této úpravě vykazovaly hydrogely zvýšenou hydrofobicitu, schopnost překonat model hematoencefalické bariéry a výraznou autofluorescenci v širokém spektru vlnových délek. Testy na různých typech lidských buněk včetně astrocytů, mikroglíí a periferních mononukleárních buněk vykazovaly vysokou biokompatibilitu a minimální toxicitu. Tyto nano-, mikrogely nebyly využity k přenosu terapeutické látky a neobsahovaly cílený transportní mechanismus. Přesto jejich fyzikálně-chemické vlastnosti vykazují slibný potenciál pro budoucí aplikace v oblasti teranostiky, zejména při léčbě onemocnění centrálního nervového systému (Vashist et al., 2020).

Experimentální genová terapie s využitím chitosanových materiálů

Genová terapie je moderní léčebná strategie, která spočívá v přenosu genetického materiálu (DNA nebo RNA) do buněk za účelem korekce genetických poruch, regulace genové exprese, či léčby různých onemocnění, včetně rakoviny, infekcí a dědičných nemocí. Cílem je buď nahradit chybějící nebo defektní gen, nebo inhibovat expresi škodlivého genu. Tato terapie se může realizovat *in vivo* nebo *ex vivo*. K přenosu genů jsou nejčastěji používány virové vektory, například adenoviry nebo lentiviry (Paredes-Hernández et al., 2025). Za poslední

desetiletí jsou intenzivně zkoumány i neviróvé vektory, mezi něž patří chitosan a jeho deriváty. Interakce prostřednictvím elektrostatické vazby mezi aminoskupinami chitosanu a fosfátovými skupinami DNA nebo RNA vzniká tzv. chitosan-DNA/RNA nanokomplex (Dong et al.,2024).

Jedním z hlavních omezení genové terapie využívající adenovirové vektory je krátká doba exprese terapeutického genu a vyvolání silné imunitní odpovědi hostitele. Tyto faktory omezují účinnost léčby a brání opakovanému podání vektoru. V nedávné studii autorů Gou et al. byl v léčbě jaterní fibrózy testován adenovirový vektor s genem pro interleukin 10 smíchaným s vodným roztokem karboxymethylchitosanu. Vzniklá směs byla injekčně podávána modelovým myším intrahepatálně. Vědci zjistili, že přidaný roztok k adenovirovému vektoru výrazně prodloužil expresi transgenů o 7 dní. Opakovaná aplikace adenoviru v kombinaci s karboxymethylchitosanem vedla k výraznému zmírnění imunitní odpovědi a jaterní fibrózy. Histologické a imunochemické vyšetření potvrdilo snížené ukládání kolagenu a potlačení aktivace itových buněk jater. Přidaný karboxymethylchitosan tak umožnil opakované podání adenoviru bez toxických účinků, čímž významně zlepšil účinnost genové terapie při léčbě onemocnění jater (Gou et al.,2022).

Cílené doručování genetického materiálu v chitosanových nano-, mikročástic bylo zkoumáno v terapiích několika onemocnění. Například Khademi et al ve své studii navrhli a testovali duálně cílený systém pro doručení CRISPR/Cas9 do nádorových buněk, který kombinuje nanočástice chitosanu s povrchově funkcionalizovanou kyselinou hyaluronovou s aptamerem AS1411. Cílem bylo efektivně „knockoutovat“ onkogenní gen FOXM1, který je nadměrně exprimován u mnoha typů nádorových onemocnění, a tím potlačit proliferaci a migraci těchto buněk. V *in vitro* testech na nádorových liniích prsou, plic a děložního hrdla vedl systém CRISPR/Cas9 zapouzdřený v chitosanových částicích k významnému snížení viability buněk, zatímco vliv na nenádorovou linii ledvin byl minimální. *In vivo* studie na myších modelech potvrdily zpomalení růstu nádoru bez známek systémové toxicity (Khademi et al., 2022).

Podobně ve studii Xue et al. pomocí genové terapie cílili na léčbu Parkinsonovy choroby. Vytvořili nanočástice na bázi chitosanu, které nesou plazmidovou DNA s nervovým růstovým faktorem a přírodním antioxidantem acteosid. Výsledky *in vitro* a *in vivo* ukázaly sníženou expresi α -synukleinu (marker Parkinsonovy choroby), zvýšenou produkci dopaminu, zlepšení motorických funkcí a bez prokázané systémové toxicity. Autoři nanočástice pro

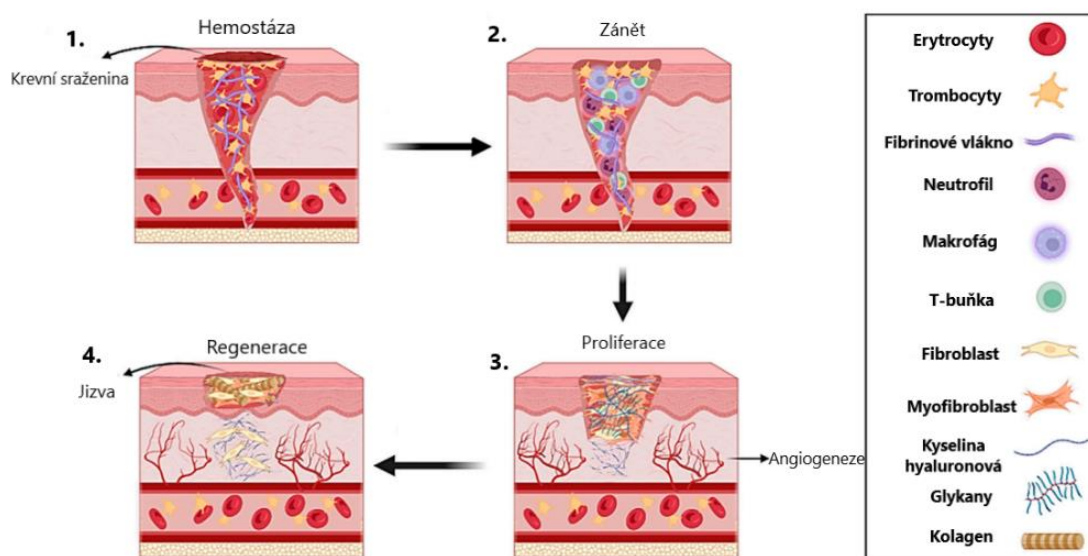
genovou terapii Parkinsonovy choroby hodnotí jako slibný systém doručení léčiv pro další vývoj v léčbě (Xue et al., 2020).

Studie Campos et al. a Sava et al. se zabývali systémy doručování siRNA založeného na chitosanových mikro- a nanočásticích v oblasti antivirové a neurodegenerativní terapie. Campos et al. připravili a testovali mikročástice chitosanu s enkapsulovanou siRNA pro potlačení replikace viru HIV-1. Jako cílová sekvence byla zvolena siRNA namířená proti *tat/rev* (regulační proteiny) genům HIV-1. Navržený systém efektivně potlačil replikaci viru a při porovnání s nevirovým nosičem polyethyleninem vykazoval slibnější účinky, zatímco s komerčně liposomálním systémem (ESCORT) vykazoval srovnatelný efekt. Zajímavým zjištěním bylo, že mikročástice chitosanu bez siRNA vykazovaly částečný antivirový účinek, což naznačuje jeho možný synergický efekt při kombinaci s genovou terapií (Chronopoulou et al., 2022). Sava a kol. vyvinuli intranazální systém genové terapie využívající chitosanové nanočástice k doručení siRNA cílené proti genu HTT. Tento gen je zodpovědný za vznik Huntingtonovy choroby. Výsledek vedl k efektivnímu snížení exprese HTT genu v strukturách mozku laboratorních myší (Sava et al., 2020). Stejní autoři později popsali kinetiku účinku pro nastavení vhodného dávkování (Sava et al., 2021).

Výzkum chitosanových hydrogelů v procesu hojení ran

Hojení ran je komplexní biologický proces, který probíhá ve čtyřech základních fázích: hemostáza, zánět, proliferace a remodelace. V případě narušení jedné z těchto fází dochází k prodloužení nebo patologickému hojení, což je časté zejména u chronických ran. Ideální materiály pro péči o rány by měly být biologicky odbouratelné, biokompatibilní, mechanicky stabilní, sterilní, udržovat optimální hydrataci tkání (vlhkost), zastavovat krvácení, podporovat angiogenezi, proliferaci, remodelaci, bránit kolonizaci rány bakteriemi a potlačit vznik biofilmu

(Yu et al., 2022). Na obr. č. 8 lze vidět fyziologický proces hojení ran ve čtyřech fázích s účastněnými složkami extracelulární matrix a buňkami lidského organismu.



Obrázek 8: Proces hojení ran, převzato a upraveno podle Ansari et Darvishi, 2024.

V akutních poraněních, kde je prioritou rychlá hemostáza, prokázaly chitosanové hemostatické materiály vysokou účinnost. Kationtový charakter polymeru podporuje agregaci erytrocytů a aktivaci destiček, čímž urychluje hemostázu. Předpokládá se, že chitosan neindikuje polymeraci fibrinu prostřednictvím koagulačních faktorů, ale skrze fyzikálních interakcí s krevními elementy (Yu et al., 2022). Pro účinnou zástavu krvácení Peng et al. připravili hydrogel na bázi hydroxypropylchitosanu a ϵ -poly-L-lysinu s injektovatelnými a samoléčebnými vlastnostmi. Výsledky *in vitro* a *in vivo* ukázaly, že tento hydrogel podpořil rychlou zástavu krvácení (Peng et al., 2024).

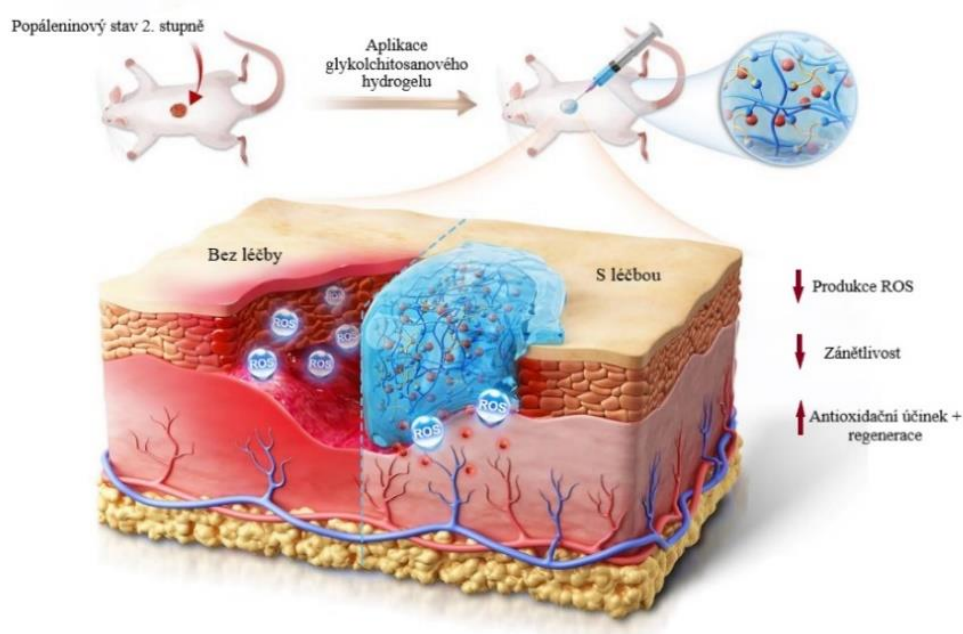
Chitosan, díky své kationtové povaze nevykazuje pouze hemostatické vlastnosti, ale i antibakteriální účinek zprostředkovaný narušením buněčných membrán bakterií, které jsou negativně nabitě. Kromě toho je také známý svými mukoadhezivními vlastnostmi, spojenými s hydroxylovými a aminovými skupinami. Ty mohou interagovat se skupinami kyseliny sialové v glykoproteinech mucinu za vzniku vodíkových vazeb a elektrostatických interakcí (Maiz-Fernández et al., 2021). Antimikrobiální účinky chitosanu působí odlišným způsobem proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím v závislosti na příslušné struktuře buněčné membrány. U gramnegativních bakterií interaguje s aniontovými strukturami přítomnými na

jejich povrchu, jako jsou lipopolysacharidy a proteiny. U grampozitivních bakterií interaguje přímo s vrstvou jejich buněčné stěny sestávající z negativních nábojů peptidoglykanu a teichoových kyselin. Ve studii Guarnieri et al. a Abedian et al. testovali antimikrobiální účinek chitosanových roztoků s různými molekulovými hmotnostmi. Guarnieri et al. zjistili, že chitosan s nízkou MW má vyšší antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím (Guarnieri et al., 2022). Naopak Abedian et al. uvedli, vysokomolekulární chitosan vykazoval vyšším antimikrobiálním účinkem proti grampozitivním bakteriím. Autoři dále uvádějí, že korelace mezi MW chitosanu a jeho antimikrobiální aktivitou je potřeba dále studovat (Abedian et al., 2019). V jiné studii, Far et al., připravili a testovali porézní hydrogely na bázi chitosanu zesítněné želatinou, které byly navíc obohaceny o kovové ionty, konkrétně stříbra, mědi a zinku. Cílem bylo zhodnotit jejich antibakteriální účinnost proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*. Výsledky jejich studie prokázaly, že chitosanové hydrogely obohacené o kovové ionty, zejména stříbra, mají významnou antibakteriální aktivitu proti grampozitivním, ale i gramnegativním bakteriím. Tyto hydrogely také vykazovaly dobrou biokompatibilitu, což naznačuje jejich potenciál pro aplikace v hojení ran a prevenci infekcí (Far et al., 2024).

Chitosanové materiály, zejména hydrogely, přirozeně napodobují extracelulární matrix, a tím podporují adhezi, proliferaci a migraci buněk. V práci Zhang et al. vyvinuli hydrogel na bázi karboxymethylchitosanu, oligoprokyanidinů a oxidovaného dextranu citlivý na pH s inkorporovaným deferoxaminem, látkou s antioxidačními a proangiogenními účinky. Hydrogel využívá pH-senzitivní vazby (Schiffovy báze), které se v kyselém prostředí chronických ran rozkládají, což umožňuje řízené uvolňování deferoxaminu přímo do postižené oblasti. Testy *in vitro* prokázaly biokompatibilitu, protizánětlivé a proangiogenní účinky hydrogelu. *In vivo* testy na myších s diabetem potvrdily zlepšení antioxidačního stavu, modulaci imunitní odpovědi a urychlení hojení ran, což činí tento hydrogel slibným kandidátem pro klinické aplikace ve formě krytí diabetických ran (Zhang et al., 2025).

Chitosanové hydrogely jsou velmi často používány pro léčbu popáleninových ran. Například Zheng et al. vytvořili vícevrstevný chitosanový hydrogel ve formě obvazového krytí určeného k první pomoci při popáleninách druhého stupně. Hydrogel disponoval rychlým chladícím efektem, výrazným protizánětlivým a antibakteriálním účinkem, podporoval angiogenezi, a urychlil regeneraci rány (Zheng et al., 2023). Práce Ren et al. se rovněž zabývala přípravou chitosanového hydrogelu určeného k první pomoci při popáleninách 2. stupně. Na

rozdíl od Zheng et al. autoři vytvořili injekčně podávaný hydrogel na bázi glykolchitosanu obohaceného kyselinou salvianolovou B. Tato kyselina je přírodní polyfenolická sloučenina s antioxidačním účinkem, která byla použita k ochraně tkání před oxidačním poškozením produkcí ROS (Ren et al., 2024). Jiní autoři (Wang a kol.) připravili chitosanový hydrogel obohacený o esenciální olej z eukalyptu, který byl určen pro léčbu infikovaných popáleninových ran (Wang et al., 2021). Valadi et al. na druhou stranu syntetizovali kompozitní hydrogel na bázi alginátu a chitosanu, obohaceného o silymarin (ostropestřec mariánský) s nanočásticemi oxidu zinečnatého pro léčbu závažnějších popáleninových stavů. U obou studií nebylo přiblíženo, o jaké popáleninové stavy se jedná. (Valadi et al., 2024). Na obr. č. 9 lze vidět příklad injekčně aplikovaného hydrogelu na bázi chitosanu k první pomoci při popáleninových stavech 2. stupně.



Obrázek 9: Léčba hydrogelem na bázi chitosanu při popáleninových stavech 2. stupně, převzato a upraveno podle Ren et al., 2024.

Ve své přehledové studii Rejinold et al. shrnují aktuální poznatky o využití chitosanu a jeho derivátů v oblasti kosmeceutik, a to zejména v péči o pokožku, vlasy a dutinu ústní. Díky svým vlastnostem, je chitosan vnímán jako slibná složka pro vývoj topických přípravků. V péči o pokožku nachází uplatnění zejména ve formě hydrogelů, nanovláken a náplastí, kde přispívá

k urychlení hojení ran, hydrataci, zpomalení stárnutí kůže či léčbě akné. Na trhu jsou již dostupné například hemostatické obvazy na bázi chitosanu (ChitoGauze®, HemCon®) a některé přírodní krémy a séra. Ve vlasové kosmetice se chitosan využívá zejména v šamponech a kondicionérech pro ochranu a regeneraci vlasového vlákna, zatímco pokročilejší formulace s chitosanovými nanosystémy pro stimulaci růstu vlasů zatím zůstávají ve fázi výzkumu. V oblasti dentální péče je chitosan součástí zubních past a ústních vod, kde působí antimikrobiálně a redukuje tvorbu zubního plaku. Mezi komerčně dostupné přípravky patří například Curaprox Perio+, Splat Biocalcium nebo Lacalut aktiv. Autoři zároveň upozorňují na potřebu dalšího výzkumu a standardizace, která by umožnila širší využití chitosanových systémů v kosmetice i medicíně (Rejinold et al., 2021).

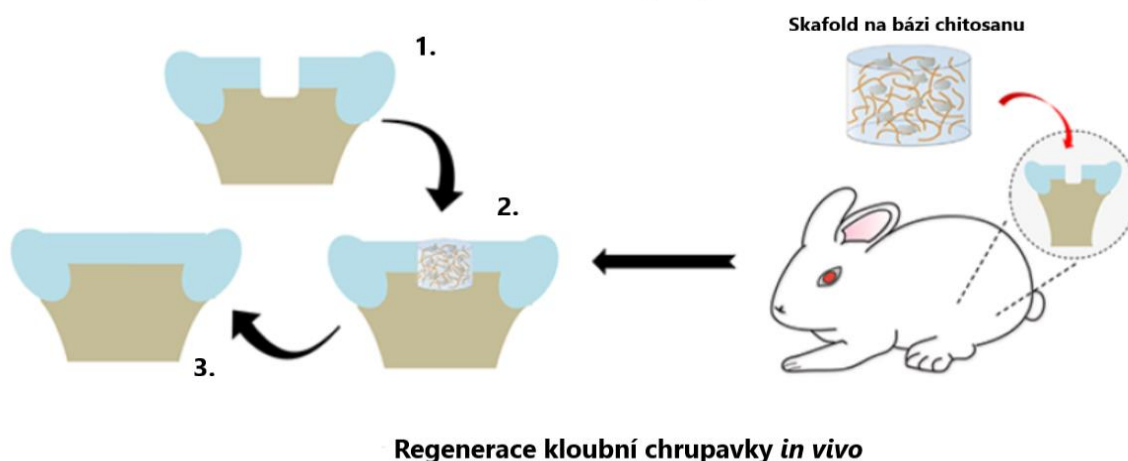
2.3.2 Chitosanové materiály testovány v tkáňovém inženýrství

V posledních desetiletích přitahují polysacharidy značnou pozornost jako přírodní materiály vhodné pro biomedicínské aplikace. Především jsou využívány pro jejich funkční skupiny užitečné ke zlepšení biologických a mechanických vlastností. Z polysacharidů je nejpoužívanější chitosan díky své podobnosti s přirozeně se vyskytujícím glykosaminoglykanem a jeho vynikajícími vlastnostmi. Mnoho studií se soustředí na vývoj 3D struktur tzv. skafoldů, které mohou sloužit jako dočasná kostra pro růst buněk a regeneraci tkání (Tao et al., 2020). Skafoldy jsou trojrozměrné systémy vybavené vysoce porézní strukturou ideálního prostředí pro uchycení a proliferaci buněk, čímž napodobují extracelulární matrix. Po vytvoření nové tkáně jsou skafoldy postupně degradovány, což vede k přirozené obnově matrix. Je důležité, aby 3D struktura nosiče adekvátně reagovala na mechanické zatížení během regenerace tkáně. Hlavní úlohou skafoldů je napodobit matrix přirozeného prostředí (kůže, svaly, chrupavky a kosti) a zajistit bioaktivitu podporující buněčnou adhezi a růst nové tkáně. Zároveň je kladen důraz na biokompatibilitu, aby se zabránilo jakékoli imunitní reakci. Pro různé aplikace tkáňového inženýrství byly jako materiály skafoldů zkoumány alifatické polyestery (např. polykaprolakton, kyselina polymléčná), polyester-uretany a biopolymery, zejména polysacharidy, byly zkoumány jako vhodné skafoldy pro různé aplikace tkáňového inženýrství (Silvestro et al., 2020).

Léčba kostních defektů zahrnuje transplantaci autologních nebo alogenních kostních štěpů. Tyto konvenční terapie však nejsou vhodné v případě hojení větších kostních úseků. Poškozená tkáň periostu znesnadňuje adhezi a migraci osteoblastů a kmenových buněk, čímž

nedochází k optimální osteogenezi. Ve studiu Tao et al. připravili bifunkční umělý periost pomocí mikrovláken na bázi polykaprolaktonu a karboxymethylchitosanu s alginátem sodným. Testovali mechanické vlastnosti tohoto skafoldu, který vykazoval vysoký modul pružnosti. Mezi aminoskupinami karboxymethylchitosanu a alginátu došlo k vytvoření elektrostatických sil a vodíkových vazeb. To vedlo k jejich propletení a následné chelataci vápenatých kationtů, díky čemuž byl apatit efektivně ukládán do umělého periostu. Zkoumané osteoblasty dobře adherovaly na chitosanová mikrovlákná, čímž byl podpořen jejich růst a diferenciace. Na základě těchto výsledků, autoři uvedli, že uměle vyrobená okostice může být srovnatelná s nativní, a být použita k potenciální léčbě kostních defektů velkého rozsahu. Nicméně jsou nutné další a podrobnější studie *in vitro* a v budoucnu klinické studie *in vivo* (Tao et al., 2020).

Kloubní chrupavka je podpůrná pojivová tkáň složená z chondrocytů a extracelulární matrix bohaté na proteoglykany, kolagen typu II a elastin, přičemž její omezená regenerační schopnost souvisí s absencí cévního zásobení. Shen et al. vyvinuli biomimetický skafold na bázi chitosanu pro regeneraci kloubní chrupavky, který obsahoval porézní strukturu vytvořenou začleněním krátkých vláken PLGA a extracelulární matrix chrupavky. Skafold vykazoval vhodné mechanické vlastnosti, podporoval adhezi, proliferaci a chondrogenezi králičích chondrocytů *in vitro* bez známek toxicity. *In vivo* testy na králičích modelech s defektem chrupavky potvrdily tvorbu vysoce organizované nové tkáně s vysokým obsahem proteoglykanů a kolagenu typu II bez zánětlivé reakce. (Shen et al., 2021). Použití skafoldu na králičím modelu je znázorněno na obr. č. 10.



Obrázek 10: Regenerace kloubní chrupavky skafoldem na bázi chitosanu, převzato a upraveno podle Shen et al., 2021.

Závažné poranění míchy nebo míšních nervů vede k částečné či úplné ztrátě senzorických a motorických funkcí. Correia et al. připravili hydrogel na bázi chitosanu funkcionalizovaného katecholovými skupinami s β -glycerofosfátem. Hydrogel byl připraven k injekční aplikaci pro eliminaci invazivního zákroku. Z výsledků *in vitro* bylo zjištěno, že hydrogel vykazoval samoléčebné vlastnosti, kdy spontánně obnovoval tvar a podporoval regeneraci poškozené tkáně (Correia et al., 2025).

Infarkt myokardu je považován za akutní nekrózu kardiomyocytů vznikající v důsledku náhlého uzávěru věnčitých tepen. Pro buňky myokardu je typická nízká schopnost regenerace. Pro léčbu akutního infarktu myokardu Wu et al. vyvinuli hydrogel na bázi chitosanu a fibroinu z hedvábí se začleněnými nanočásticemi zlata pro regeneraci srdeční tkáně k injekčnímu podání. V testech *in vitro* hydrogel podporoval adhezi, proliferaci a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk kokultivovaných s potkaními kardiomyoblasty. U potkanů s infarktem myokardu aplikace hydrogelu významně podpořila obnovu tkáně a zlepšila srdeční funkci během dvoutýdenní léčby. Tento systém může být slibnou strategií pro terapii akutního infarktu a dalších srdečních onemocnění. (Wu et al., 2023). Ve studii et al. se naopak zaměřili na léčbu infarktu myokardu pomocí koronární angioplastiky. Autoři vyrobili koronární stent na bázi polylaktidu, na kterém byl nanesen hydrogelový povlak k zabránění trombózy. Hydrogel byl připraven z karboxymethylchitosanu, oxidovaného alginátu sodného, methylkrylované želatiny a kyseliny tříslové k pevnému zachycení hydrogelu k stentu. Na základě výsledků *in vitro* a *in vivo*, navázaný hydrogel zabránil vzniku trombózy, byl biokompatibilní a vykazoval antibakteriální účinky bez známek toxicity (Qiu et al., 2024).

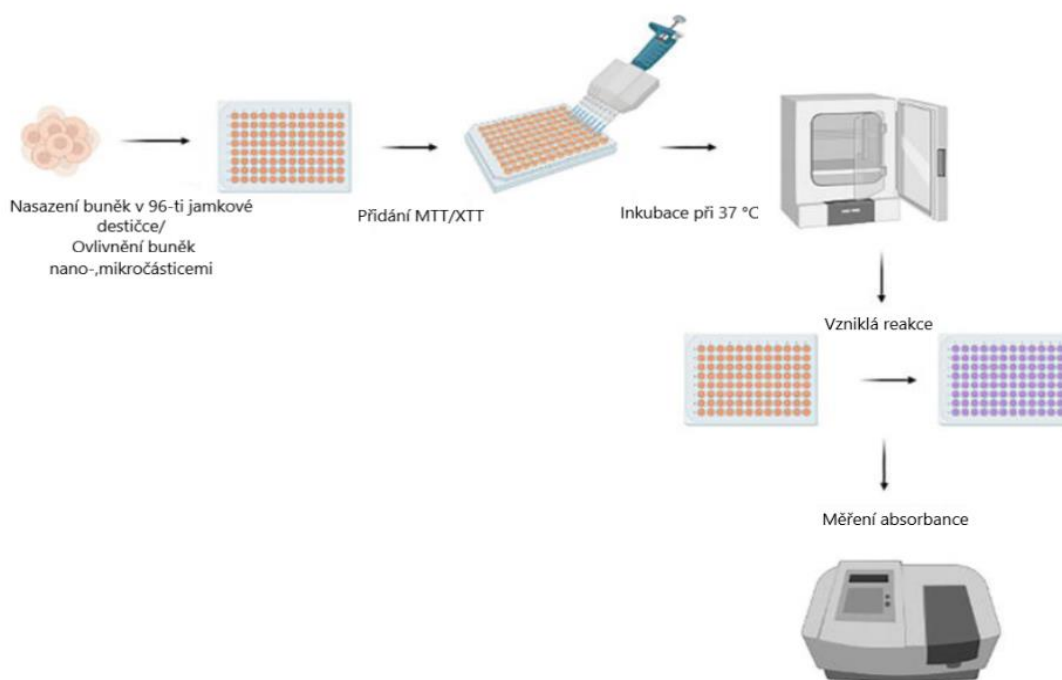
2.4 *In vitro* testování cytotoxicity chitosanových materiálů

K hodnocení cytotoxicity chitosanových materiálů se v *in vitro* podmínkách běžně využívají kolorimetrické metody, které sledují metabolickou aktivitu buněk prostřednictvím přeměny tetrazoliových solí na barevné produkty. Mezi nejpoužívanější patří MTT test, kde dochází k redukci tetrazolu na nerozpustný fialový formazán, a především XTT test, který poskytuje rozpustný oranžový produkt a nevyžaduje dodatečnou solubilizaci (Tyliszczak et al., 2017). Dalšími testy na bázi tetrazoliových solí bez solubilizace jsou MTS, WST-1 nebo WST-8 metody (Šebek, 2018).

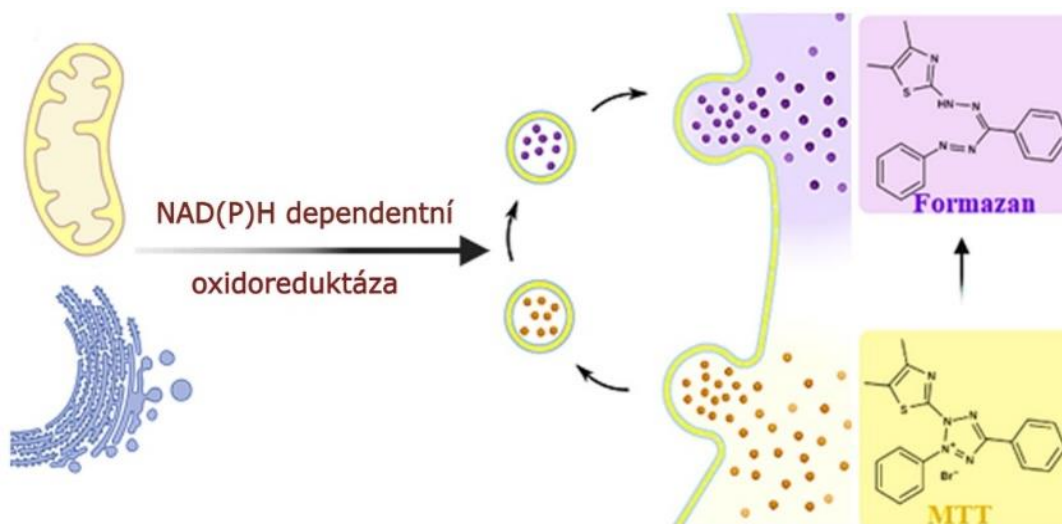
Kromě těchto metod existují i další přístupy ke zjištění buněčné odpovědi. Testy proliferace, jako jsou BrdU (bromodeoxyuridin) (Hsueh et al., 2019) a EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) (Chen et al., 2025), umožňují sledovat nově syntetizovanou DNA, zatímco systém xCELLigence (Kahlous et al., 2022) využívá změn elektrické impedance k nepřetržitému měření buněčného růstu. Testy integrity membrán, jako je barvení trypanovou modří (Ekinci et Güzel, 2019), slouží k odlišení živých a mrtvých buněk na základě propustnosti membrány, a LDH test (Vashist et al., 2020) kvantifikuje uvolnění laktátdehydrogenázy jako markeru poškození buněčné membrány. Další možností jsou bioluminiscenční testy založené na měření ATP (Li et al., 2025), které detekují hladinu intracelulárního ATP jako ukazatele životaschopnosti buněk, a také resazurinový test (Alfaro-González et al., 2018), který je založen na redukci modrého resazurinu na fluorescenční resorufin pomocí mitochondriální reductázy. Tyto metody lze vhodně kombinovat s kolorimetrickými testy pro komplexnější hodnocení toxicity testovaných materiálů.

2.4.1 MTT test

Tetrazoliové soli se v oblasti redoxní histochemie a biochemických aplikací využívají již více než půl století. Významný pokrok v jejich praktickém uplatnění přinesl v roce 1983 Dr. Mosmann, který vyvinul dosud nejrozšířenější metodu hodnocení cytotoxicity a buněčné proliferace tzv. MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Princip testu spočívá v redukci tetrazoliové soli MTT na nerozpustný fialový formazán. Tato přeměna je katalyzována buněčnými enzymy, zejména těmi lokalizovanými v endoplazmatickém retikulu, NAD(P)H-dependentními oxidoreduktázami. Vzniklý formazán tvoří krystaly, které jsou ve vodném prostředí nerozpustné, a proto je před spektrofotometrickým měřením nutná jejich solubilizace pomocí organického rozpouštědla. Nejčastěji používanými rozpouštědly je dimethylsulfoxid (DMSO) nebo dodecylsulfát sodný (SDS) (Nga et al., 2020). Obr. č. 11 a 12 představuje schéma redukce tetrazoliové soli MTT na nerozpustný formazán.



Obrázek 11: Princip tetrazoliových testů, převzato a upraveno podle Karatop et al., 2022.



Obrázek 12: Redukce tetrazoliových solí MTT na nerozpustný formazan, převzato a upraveno podle Khalef et al., 2024.

MTT a XTT testy patří mezi nejčastěji využívané kolorimetrické metody pro hodnocení buněčné viability, založené na redukci tetrazoliových solí v metabolicky aktivních buňkách. Zatímco princip obou testů je obdobný, rozdíly spočívají především v chemických vlastnostech použité soli, typu výsledného produktu a způsobu měření. V MTT testu je tetrazolium sůl metabolizována na nerozpustný fialový formazan, který je nutné po inkubaci rozpustit organickým rozpouštědlem (DMSO nebo SDS) pro kvantifikaci absorpance (Nga et al., 2020). Oproti tomu XTT test produkuje ve vodě rozpustný oranžový formazan, čímž odpadá potřeba přídavného kroku a umožňuje přímé a rychlé měření intenzity zbarvení pomocí spektrofotometru. Navíc je XTT test vhodný i pro kontinuální měření kinetiky reakce, zatímco MTT test umožňuje pouze jednorázové odečty po ukončení reakce. Dalším rozdílem je lokalizace probíhající redukce. U testu MTT probíhá převážně na úrovni mitochondriálních enzymů, zatímco u XTT je redukce umožněna i na buněčné membráně, zejména za přítomnosti elektronového přenašeče PMS (fenazinmethosulfátu) (Lutter et al., 2017, Nga et al., 2020). XTT test se tedy často upřednostňuje v aplikacích, kde je vyžadováno rychlé, méně invazivní a přesnější měření životaschopnosti, přičemž zároveň eliminuje některé nedostatky MTT testu, jako je tvorba nerozpustných krystalů či vyšší variabilita při rozpouštění. Oba testy však zůstávají důležitými nástroji v oblasti toxikologie, farmakologie i vývoje biomateriálů (Riss et al., 2018).

V rámci využití MTT testu k hodnocení toxicity a biokompatibility chitosanových materiálů bylo možné identifikovat různé formy zpracování chitosanu a jejich aplikace. V jedné ze studií byly testovány chitosanové nanočástice s navázaným doxorubicinem, které byly dále modifikovány kyselinou listovou za účelem cíleného doručení léčiva do nádorových buněk jaterního karcinomu (Ye et al., 2018). V jiné práci byly hodnoceny chitosanové filmy a hydrogely s graftedými oligolaktidovými řetězci (chitosan-g-oligolaktid), zaměřené na podporu buněčné proliferace a osteogenní diferenciaci (Piwowarczyk et al., 2022). Dále byly testovány nanovlákná připravená ze směsi chitosanu a polyvinylalkoholu (PVA), která byla zesílena přísádkem boraxu, za účelem zvýšit mechanickou stabilitu i buněčnou kompatibilitu (Akduman et al., 2023). V oblasti potravinářských obalů byly sledovány chitosan/PVA filmy obohacené o antokyany z rostliny *Stachytarpheta jamaicensis*, které měly za cíl nejen zachování bezpečnosti pro styk s potravinami, ale i funkci barevného indikátoru čerstvosti (Malik et al., 2022). MTT testy ve všech těchto případech potvrdily, že dané formy chitosanu byly buňkami

dobře tolerovány a ve většině případů vykazovaly i stimulační efekt na buněčný růst, čímž se prokázala jejich biokompatibilita a potenciál pro další aplikace (Piwowarczyk et al., 2022).

2.4.2 XTT test

Metoda XTT patří mezi kolorimetrické metody hodnocení životaschopnosti buněk, využívající tetrazoliovou sůl. Konkrétně se jedná o sodnou sůl kyseliny 3'-[1-fenylaminokarbonyl]-3,4-tetrazolium-bis(4-methoxy-6-nitro)benzensulfonové, která je za přítomnosti aktivních buněk metabolizována na rozpustný oranžový formazan. Reakce probíhá v mitochondriích živých buněk, kde dochází k redukci XTT prostřednictvím enzymu sukcinátdehydrogenázy (součást komplexu II dýchacího řetězce). Součástí reakční směsi je také fenazinmethosulfát (PMS), který slouží jako mezipřenašeč elektronů, je neenzymaticky redukován NADH a následně předává elektrony tetrazoliové soli. XTT, jakožto aniontová a ve vodě rozpustná sloučenina, neproniká do intracelulárního prostoru; k redukci proto dochází především na buněčném povrchu či v oblasti plazmatické membrány prostřednictvím transmembránového elektronového přenosu. Výsledná intenzita oranžového zbarvení ve studovaných mikrotitračních jamkách je úměrná počtu životaschopných buněk a je měřitelná spektrofotometricky na vlnové délce 450–470 nm pomocí ELISA readeru. Vztah mezi koncentrací živých buněk a intenzitou zbarvení je lineární. Pouze vitální buňky jsou schopny redukovat XTT na barevný produkt (Riss et al., 2018; Lutter et al., 2017). Na obr. č. 13 (níže) lze vidět reakci redukce tetrazoliové soli XTT na rozpustný formazan.

V buněčné biologii se test XTT využívá především pro hodnocení cytotoxicity léčiv, nanomateriálů, přírodních látek, měření buněčné viability a proliferace bioaktivity (Fulindi et kol., 2023). Metodu lze použít na adherentní i suspendované *in vitro* zvířecí nebo lidské buněčné linie (Lutter et kol., 2017). V následujících odstavcích jsou shrnuty příklady použití XTT testu v aktuální vědecké literatuře, s důrazem na cytotoxicitu a buněčnou viabilitu buněk ovlivněnými chitosanovými částicemi.

Ve studii Jakaew et al. navrhli a testovali vakcínu proti COVID-19, která obsahovala receptor-vázající doménu z viru SARS-CoV-2. Ta byla enkapsulována v trimethylchitosanových nanočásticích. Primární lidské nosní epitelové buňky byly vystaveny různým koncentracím (25–50–100–200 µg/ml) nanočástic a životaschopnost byla hodnocena po 24 a 48 hodinách inkubace. Celková toxicita nanočástic nebyla detekována se žádnou použitou koncentrací. Po 48 hodinách, u koncentrace 100 µg/ml, byla životaschopnost buněk

s nanočásticemi bez receptoru 100 %, pro buňky s nanočásticemi s receptorem byla viabilita $90,12 \pm 0,52$ %. U koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ po 48 hodinách se viabilita buněk snížila na 80 %. Na základě testu XTT a dalších měření *in vitro*, autoři hodnotí vakcínu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ jako účinnou a biokompatibilní pro intranasální podání a potenciální využití v dalších studiích (Jakaew et al., 2024).

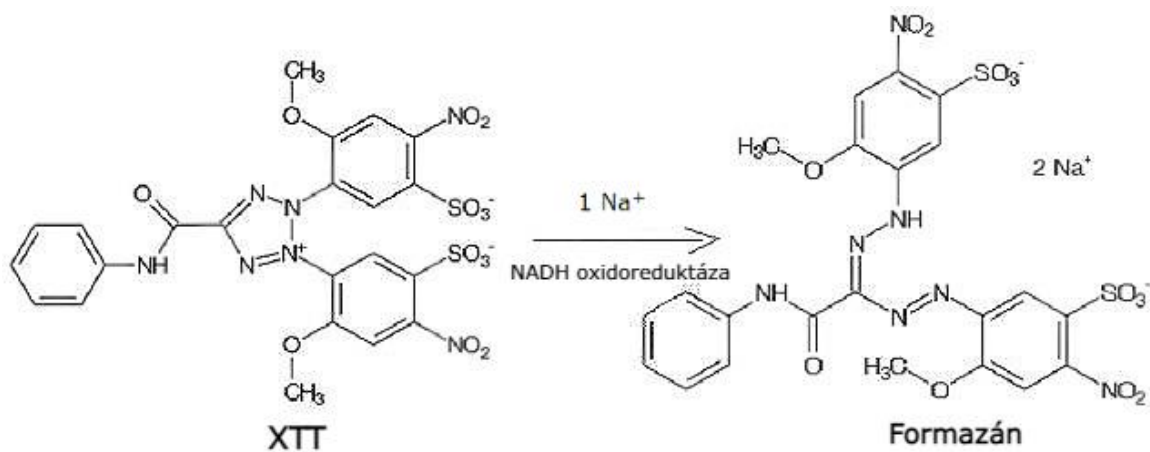
Ve studii Costa et al. testovali biokompatibilitu chitosanových mikročástic na lidské keratinocytové buněčné linii HaCaT. Autoři připravili chitosanové mikročástice zesítené tripolyfosfátem. Buňky byly ovlivněny koncentrací částic 0,5–1,0–5,0–7,0 mg/ml a měřeny po 24 hodinách. Koncentrace částic do 5 mg/ml vykazovaly viabilitu keratinocytů 100 %. Autoři uvádějí zvýšení buněčné viability u koncentrace 7 mg/ml až na 120 %, což může naznačovat stimulaci proliferace. Zvýšení aktivity vysvětlují dvěma způsoby. První z nich je vliv samotných mikročástic, které mohou v dané koncentraci fungovat jako bioaktivní substrát podporující adhezi a růst buněk, čímž stimulují metabolismus. Dále upozorňují na možnost nerovnoměrného rozdělení buněk nebo částic v jamkách, což by mohlo zvýšit měřenou intenzitu absorbance XTT bez přímého vztahu k proliferaci (Costa et. al., 2023). Podobně ve studii Radwan-Pragłowska a kol. byla viabilita nad 100 %. V této práci byly ale použity myší buněčné linie podobné fibroblastům L-929 a lidské primární fibroblasty. Testovali dvouvrstvé nanovláknenné scaffoldy na bázi PLA a acylovaného chitosanu, modifikované nanočásticemi ZnO, Fe₃O₄ a Au. Všechny vzorky vykazovaly vyšší metabolickou aktivitu oproti negativní kontrole, což naznačuje nejen netoxicitu skafoldu, ale i stimulaci proliferace. Nejvyšší proliferaci vyvolaly s Au nanočásticemi. Buněčná linie L-929 vykazovala viabilitu až 145 % a lidské primární fibroblasty 139 %. Autoři interpretují zvýšenou viabilitu jako projev bioaktivního účinku použitého materiálu. Zvláště nanočástice zlata mohly podpořit buněčnou proliferaci díky aktivaci metabolických drah nebo interakci s povrchem skafoldu. U fibroblastové linie L-929 byla stimulace pozorována již po 48 hodinách, zatímco u primárních fibroblastů byla hodnocena po 168 hodinách, což odráží rozdíly v růstové kinetice těchto buněk. Vyšší hodnota viability je tedy chápána jako pozitivní indikace proliferačního potenciálu materiálu (Radwan-Pragłowska et al., 2020).

Studie Ozturt a kol. hodnotila protinádorovou aktivitu lipid-chitosanových nanočástic obsahujících paklitaxel a nitidin na buněčné linii A2780 a její rezistentní variantě A2780/PTX (paklitaxel). Samotný PTX vykazoval sníženou účinnost na rezistentní buňky ($\text{IC}_{50} = 255,22$ nM), zatímco jeho kombinace s nitidinem účinnost výrazně zvýšila ($\text{IC}_{50} = 81,84$ nM).

Nejvýraznější pokles viability byl zaznamenán u nanoformulace lipid-chitosanové NPs obsahující paklitaxel a nitidin, která snížila životaschopnost buněk na přibližně 42 % u obou linií. Výsledky XTT testu prokázaly schopnost těchto nanočástic zlepšit cytotoxický účinek léčiva, přičemž navazující testy potvrdily také inhibici transportéru ABCB1 a zvýšení oxidačního stresu vedoucího k apoptóze. Autoři uvádějí, že nanočástice s koenkapsulovanými látkami tak představují perspektivní přístup k překonání chemorezistence u karcinomu vaječnicků (Ozturt et al., 2025).

Ve studii Panwar et al. byly připraveny chitosanové nanočástice enkapsulující ferulovou kyselinu metodou ionotropní gelace pomocí tripolyfosfátu. Cílem výzkumu bylo zhodnotit antibiofilmovou účinnost těchto nanočástic proti biofilmům *Candida albicans* a zároveň posoudit jejich cytotoxicitu vůči lidským buňkám HEK-293 pomocí XTT testu. Výsledky ukázaly, že zatímco samotné chitosanové částice nebo volná ferulová kyselina měly pouze omezený účinek, nanočástice s kyselinou ferulovou významně snížily metabolickou aktivitu biofilmu na 22,5 %. Zároveň vykazovaly vysokou biokompatibilitu, neboť viabilita HEK-293 buněk zůstala při nižších koncentracích nanočástic nad 90 %. Vyšší dávky vedly k poklesu viability na 40 %, což podtrhuje význam optimalizace dávkování (Panwar et al., 2016).

Na základě vybraných studií je zřejmé, že XTT test představuje univerzální nástroj pro hodnocení buněčné viability, toxicity (Ozturt et al., 2025), biokompatibility, proliferace (Costa et al., 2023) a antimikrobiální účinnosti (Panwar et al., 2016). Všechny uvedené studie potvrzují, že chitosanové materiály jsou vhodným základem pro vývoj netoxických, biologicky aktivních a multifunkčních systémů využitelných v oblasti medicíny nebo bioinženýrství (Radwan-Pragłowska et al., 2020). Na obr. č. 13 lze vidět schéma redukce tetrazoliové soli XTT na rozpustný formazán.



Obrázek 13: Redukce tetrazoliové soli XTT na rozpustný formazán, převzato a upraveno podle Sukhramani et al., 2011.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Pomůcky a přístroje

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 – Heiligenstadt, Německo
- Analyzátor Beckman Coulter Counter – Beckman Coulter, USA
- Analyzátor HORIBA Scientific SZ-100 nanopartica – Lyon, Francie, s příslušenstvím:
 - jednorázové dvoustěnné spektrofotometrické kyvety Brand – Praha, ČR
 - elektrodová semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm – Mnichov, Německo
- Badatelský fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i – Nikon, Japonsko
- Centrifuga 5702 Eppendorf, rotor A-4-38 – Hamburk, Německo
- Centrifuga Universal 320 R– Hettich, Německo
- CO2 inkubátor Memmert INC 108 – Memmert, Německo
- Laminární biohazard box třídy II ESCO BSC – ESCO, Singapur
- Magnetické míchadlo IKA TWISTER VERKON vícemístné (Praha, ČR)
- Magnetické míchadlo s ohřevem Stuart UC152 (Staffordshire, UK)
- pH metr Orion 420 (Massachusetts, USA)
- Software Tecan i-control, 1.12.4.0
- Software GraphPad QuickCalcs – GraphPad Software, USA
- Software NIS-Elements AR 5.11.03 - Nikon, Japonsko
- Software Microsoft Excel 365 - Microsoft, USA
- Spektrofotomer Tecan Infinite 200 – Tecan, Švýcarsko
- Světelný mikroskop Primo Vert – Carl Zeiss, Německo
- Ultrazvuk Sonorex Digitec – Berlín, Německo
- Vodní lázeň Precision GP 05 – Thermo Scientific, USA
- Vortex Wizard Vortex Mixer VELP – Usmate Velate, Itálie
- 0,45 µm hydrofilní filtr s celulózo-acetátovou membránou – VWR International, USA
- 2-jamkové kultivační komůrky – SPL, Korejská republika

Další pomůcky: kultivační lahvičky, centrifugační zkumavky s modrým víčkem (15 ml), mikrozukavky Eppendorf, sérologické pipety o objemech 5 ml, 10 ml a 25 ml, Pasteurovy

pipety, automatický pipetor, pipety (10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1 ml, 3 ml), multikanálová pipeta (100 μ l), 96-jamkové destičky, sterilní špičky, plastové vaničky, plastové kyvety pro počítání buněk na přístroji Beckman Coulter Counter, lékovky s víčkem o objemu 15 ml, láhve se šroubovacím uzávěrem (100 ml, 200 ml), kádinky (30 ml, 50 ml), odměrný válec, pipety (100 μ l, 1 ml, 5 ml), zkumavka Eppendorf (1 ml), centrifugační zkumavka s modrým víčkem (15 ml), plastové špičky

3.2 Chemikálie a roztoky

- Aminokyseliny (neesenciální) – Life Technologies, USA
- Antibiotika = penicilin/streptomycin – Thermo Fisher Scientific, USA
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) – Thermo Fisher Scientific, USA
- Doxorubicin (DOX) – Thermo Fisher Scientific, USA
- Dulbeccův fosfátový pufr (DPBS) – Life Technologies, USA
- Electron-coupling reagent (ECR) – Roche Diagnostic GmbH, Německo
- Fetální bovinní sérum (FBS) – Thermo Fisher Scientific, USA
- Fosfátový pufr (PBS) – Gibco, USA
- HEPES pufr – Thermo Fisher Scientific, USA
- Chitosan (CS) o nízké molekulové hmotnosti a DD 75–85 % (Sigma-Aldrich s.r.o., USA)
- L-glutamin – Thermo Fisher Scientific, USA
- LysoTracker Red DND-99 (TRITC) – Thermo Fisher Scientific, USA
- Minimum essential medium (MEM) – Life Technologies, USA
- Montovací médium ProLong™ Gold Antifade Mountant – Thermo Fisher Scientific, USA
- Přístroj na přípravu deionizované vody HALIOS NEPTEC, 0,2 μ m – Elbdal, Německo
- Pyruvát sodný – Thermo Fisher Scientific, USA
- Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium – Life Technologies, USA
- ROTI® Cell Water – Roth, Německo
- Tripolyfosfát – TPP, výrobce Sigma-Aldrich s.r.o., USA
- Trypsin – Thermo Fisher Scientific, USA
- XTT labeling reagent – Roche Diagnostic GmbH, Německo

- Zásobní roztok FITC-CS/TPP o koncentraci 2,5 mg/ml – postup podle: BOLKOVÁ, Alex. Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici. Pardubice, 2021. Diplomová práce. Univerzita Pardubice
- 70% ethanol
- 99% kyselina octová p.a., Lach-Ner, s. r. o. – Neratovice, ČR

3.3 Příprava roztoku chitosanu a tripolyfosfátu

3.3.1 Příprava zásobního roztoku chitosanu

Použitý roztok:

- 0,05% kyselina octová

Postup:

V digestoři byl připraven 0,05% roztok kyseliny octové smícháním 100 ml deionizované vody a 50,5 µl 99% kyseliny octové do řádně popsané láhve se šroubovacím víkem. Poté bylo analytických váhách naváženo 250 mg chitosanu v práškové formě. Do roztoku kyseliny octové bylo za neustálého míchání na magnetickém míchadle přidáno 250 mg navážky. Po smíchání kyseliny s navázkou následovalo měření pH roztoku, které bylo udržováno při hodnotě pH <4,8 (pro dokonalé rozpuštění chitosanu v rozmezí 4,7–4,75). K udržení pH bylo do roztoku pipetováno několik mililitrů 99% kyseliny octové. Takto připravený zásobní roztok o koncentraci 2,25 mg/ml byl na magnetickém míchadle (stupeň 4) míchán (rozpuštěn) 24 hodin při laboratorní teplotě. Hodnoty pH byly měřeny ve stejný den ještě několikrát a za 24 hodin vždy s úpravou na požadovanou mez.

3.3.2 Příprava zásobního roztoku tripolyfosfátu

Pro přípravu zásobního roztoku TPP o koncentraci 0,25 mg/ml, bylo naváženo 2,5 mg tripolyfosfátu v práškové formě na analytických váhách. Navážený TPP byl následně smíchán a rozpuštěn v 10 ml deionizované vody v 15 ml lékovce.

3.4 Příprava chitosanových částic

Submikročástice chitosanu byly připravovány v poměru 5:1 o objemu 9 ml zesílením roztoku tripolyfosfátu iontovou gelací podle protokolu v (Rampino et al., 2013). Síťování a tvorba pevné vazby probíhá mezi aminovými skupinami polyaniontu chitosanu a fosfátovými skupinami polykationtu tripolyfosfátu za vzniku sférických submikročástic (Rázga et al., 2016). Částice byly připravovány vždy v triplikátu v lékovce o objemu 15 ml.

Použité roztoky:

- zásobní roztok CS o koncentraci 2,5 mg/ml
- zásobní roztok TPP o koncentraci 0,25 mg/ml

Postup:

Zásobní roztok chitosanu byl 10x naředěn na koncentraci 0,25 mg/ml. To znamená, že do kádinky s 22,5 ml deionizované H₂O bylo napipetováno 2,25 ml zásobního roztoku chitosanu. Následně byly roztoky TPP a CS přefiltrovány přes celulózo-acetátový filtr o velikosti pórů 0,45 μm. Do každé řádně popsané lékovky bylo napipetováno 7,5 ml přefiltrovaného roztoku CS. Samotná tvorba částic probíhala v digestoři na magnetickém míchadle (stupeň 4). Za stálého míchání roztoku CS byl pomalu a konstantě pipetou přikapáván roztok TPP o objemu 1,5 ml (2x 750 μl) po kapkách v poměru 5:1. Tvorba částic probíhala po dobu 30 minut na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě 25 °C. Takto připravený vzorek submikročástic CS/TPP odpovídá hmotnosti 2,25 mg v 9 ml o koncentraci 0,25 mg/ml. Následně byly triplikáty částic použity pro měření DLS, PDI a zeta potenciálu.

3.4.1 Příprava fluorescenčně značených částic

Samotná příprava značených částic byla provedena ze zásobního roztoku FITC-CS stejným způsobem jako příprava bez značení – viz. kapitola 3.4. Práce s částicemi značenými fluoresceinem isothiokyanátem probíhala ve tmě. Lékovky byly řádně obaleny v alobalu. Částice s fluorescenčním značením byly připravovány pro experiment internalizace chitosanových částic do nádorové linie A594. Submikročástice byly připravovány v poměru 5:1 o objemu 6 ml s koncentrací 0,25 mg/ml.

3.5 Charakterizace připravených částic

Měření velikosti neboli hydrodynamického rozptylu světla, polydisperzního indexu a zeta potenciálu částic probíhalo na analyzátoru HORIBA SZ-100 Scientific.

3.5.1 Měření hydrodynamického rozptylu světla a polydisperzního indexu

Před měřením byl každý vzorek lehce promíchán kvůli sedimentaci částic a následně upraven pro samotné měření. Z lékovky byly odebrány částice o hmotnosti 250 μg , přeneseny do kyvety a naředěny deionizovanou vodou na objem 1,5 ml. Takto upravený vzorek v kyvetě byl vložen do analyzátoru. Suspenze částic byly měřeny pod úhlem 173° s indexem lomu pro chitosan 1,540 při laboratorní teplotě 25°C . Každý vzorek podléhal 12 opakování. Z těchto opakování byl pomocí analyzátoru vypočten průměr a směrodatná odchylka pro DLS a PDI. Pro hodnocení DLS byla použita hodnota „Z-average (nm)“. DLS a PDI bylo měřeno v „monodisperzním“ a „polydisperzním“ režimu.

3.5.2 Měření zeta potenciálu

Před každým měřením byla kyveta pomocí injekční stříkačky několikrát promyta deionizovanou vodou. Do předem řádně vypláchnuté elektrodické kyvety bylo pomocí injekční stříkačky aplikováno 100 μl upraveného vzorku z měření DLS a PDI, přičemž se dbalo na eliminaci nežádoucích bublin. Takto zhotovený vzorek byl přenesen do analyzátoru Horiba SZ-100 Scientific a změřen pod úhlem 90° při laboratorní teplotě 25°C . Každé měření podléhalo 12 opakování, které bylo následně zprůměrováno a vyčtena směrodatná odchylka. Pro hodnocení zeta potenciálu byla použita hodnota „Mean (mV)“.

3.5.3 Charakterizace fluorescenčně značených částic

Měření velikosti, polydisperzního indexu a zeta potenciálu fluorescenčně značených částic probíhalo stejnými postupy, jako charakterizace neznačených částic.

3.6 Zakoncentrování chitosanových částic pro buněčný experiment

Použitý roztok:

- vzorek submikročástic CS/TPP o koncentraci 0,25 mg/ml

Postup:

Vzorek s reprezentativními výsledky byl dále zpracován pro zjištění cytotoxicity na nádorových liniích v buněčné laboratoři (viz. níže). Z lékovky byl veškerý objem částic přepipetován do centrifugační tuby s modrým víčkem o objemu 15 ml a centrifugován 5 minut při 1700 g (rcf 1,7). Poté bylo z tuby opatrně odpipetováno 7,5 ml supernatantu. Zbýlých 500 µl bylo lehce promícháno pomocí pipety a přeneseno do 1 ml Eppendorfovy zkumavky. Takto zakoncentrované submikročástice o koncentraci 4 mg/ml CS/TPP v 500 µl byly přeneseny a uloženy do lednice v buněčné laboratoři do druhého dne.

3.7 Příprava médií pro buněčný experiment

Kultivační médium pro nádorovou buněčnou linií A549 bylo připraveno z MEM média o objemu 100 ml, do nějž bylo přidáno 10 ml FBS, dále 1 ml pyruvátu sodného o koncentraci 1 mM, 1 ml AMK L-glutaminu o koncentraci 2 mM a 500 µl ATB penicilin/ streptomycin.

Kultivační médium pro nádorovou linií A2780 bylo připraveno z RPMI média o objemu 100 ml., do nějž bylo přidáno 10 ml FBS, dále L-glutamin o koncentraci 2 mM, 1 ml pyruvátu sodného o koncentraci 1 mM, 500 µl penicilin/streptomycin, 1 ml HEPES pufru o koncentraci 10 mM a 1 ml neesenciálních AMK.

Inaktivační médium bylo připraveno ze základního média RPMI a FBS o objemu 100 ml, kdy pro přípravu tohoto média bylo použito 90 ml RPMI a 10 ml FBS.

Fosfátový roztok PBS, o objemu 100 ml, byl připraven naředěním koncentrovaného Dulbeccova fosfátového pufru DPBS v poměru 1:10, neboli 10 ml PBS s 90 ml Roticell water.

3.8 Příprava koncentrační řady chitosanových částic

Požadované koncentrace submikročástic CS/TPP pro stanovení cytotoxicity byly připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 4 mg/ml, Zásobní roztok byl ředěn pomocí vody pro buněčné kultury podle tabulky 1 uvedené níže.

3.9 Použité nádorové linie

Ke stanovení cytotoxické aktivity chitosanových submikročástic CS/TPP byly použity dva typy nádorových linií A549 a A2780. Buněčná linie A549 představuje nemalobuněčný adenokarcinom plic, tato linie byla použita do 21. pasáže. Buněčná linie A2780 představuje karcinom ovarií, linie byla použita do 19. pasáže. Použité nádorové buňky jsou adherentní a pocházejí z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC).

Tabulka 1: Ředění zásobního roztoku částic CS/TPP pro XTT test

Výsledná koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Objem částic CS/TPP (μl)	Objem H_2O (μl)	Celkový objem (μl)	Potřebná koncentrace (mg/ml)
200	325 (z roztoku 4 mg/ml)	—	—	4
150	225 (z 200 $\mu\text{g/ml}$)	75	300	3
100	133 (z 150 $\mu\text{g/ml}$)	67	200	2
50	50 (z 100 $\mu\text{g/ml}$)	50	100	1

3.10 Pasážování a počítání buněk

Pasážování buněk je proces odebrání a přenesení buněk vzniklé jejich kultivací do jiné kultivační nádoby s čerstvým živným médiem. Také označováno jako subkultivace, neboli dělení buněk. Pasážování probíhá před každým experimentem. Buňky se postupně množí, až do doby, kdy vytvoří na dně kultivační nádoby souvislou (konfluentní) jednoduchou vrstvu tzv. monolayer. Pasážování buněk je závislé na konfluenci vyjádřené v procentech (%). Konfluence je tzv. míra zaplnění dna kultivační nádoby buňkami. Ideální rozmezí pro pasážování je 70–90 % konfluence.

Před každým experimentem nebo samotným pasážováním byla hodnocena míra konfluence pod světelným mikroskopem. Po zjištění ideálního rozmezí konfluence byly roztoky a média vytemperovány ve vodní lázni na 37 °C. Samotné pasážování probíhalo ve sterilním prostředí laminárního biohazardního boxu II. Z kultivační nádoby bylo pomocí sérologické pipety přeneseno kultivační médium do odpadu. Do téže kultivační nádoby byly přeneseny 3 ml PBS pufru. Lehkým kývavým pohybem došlo k oplachu mrtvých buněk a celý obsah byl přenesen do odpadu. Následně byl do nádoby napipetován trypsin o objemu 3 ml, opět došlo ke kývavému pohybu lahvičky a na 8 minut byla nádoba s enzymem umístěna do 5% CO₂ inkubátoru s teplotou 37 °C. Po inkubaci neboli trypsinizaci, tedy uvolnění tzv. monolayer buněk od dna nádoby byl celý obsah resuspendován a přenesen do centrifugační zkumavky se 3 ml inaktivačního média. Následně byla nádoba propláchnutá 3 ml PBS a pufr přenesen taktéž do centrifugační zkumavky. Celý obsah zkumavky byl resuspendován a uložen do centrifugy na 5 minut při 1 500 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl supernatant pomocí Pasteurovy pipety opatrně odstraněn a vhozen do odpadu. Vytvořený sediment (paleta) buněk byl resuspendován 1 ml kultivačního média pro danou nádorovou linii a poté naředěn dalšími 4 ml téhož média. Ze zkumavky bylo následně odebráno 100 µl suspenze a přeneseno do plastové kyvety s 10 ml izotonického roztoku pro přístrojové počítání množství buněk na analyzátoru Beckman Coulter Counter. Do nové, řádně popsané nádoby s kultivačním médiem o objemu 10 ml, bylo nasazeno určité množství buněk a poté obsah s lahvičkou „vyčtverčován“. Takto připravené nové subkultivace nádorových linií byly uloženy do inkubátoru s 5% CO₂ a teplotou 37 °C na 2–3 dny.

3.11 Stanovení cytotoxicity částic pomocí testu XTT

Po zpasážování nádorových linií A549 a A2780 bylo spočítáno množství buněk (viz. postup výš) a kultivačního média pro jejich nasazení do 96-jamkové destičky. Tyto objemy byly přeneseny do nové centrifugační zkumavky, obsah resuspendován a 100 µl suspenze odebráno do kyvety s roztokem pro další měření na analyzátoru Beckman Coulter Counter. Buňka s médiem byly nasazovány v hexaplikátu pro každou sledovanou koncentraci částic, pozitivní a negativní kontrolu o objemu 95 µl. Buněčná linie A549 byla nasazována pro 5 000 buněk na jamku. Buněčná linie A2780 pro 40 000 buněk na jamku. Blank (médium bez buněk)

byl nasazen v hexaplikátu o objemu 100 µl. Pro dostatečnou adheenci buněk byly destičky uloženy na 24 hodin do inkubátoru.

Druhý den byly submikročástice CS/TPP homogenizovány 20 minut v ultrazvuku. Mezitím bylo vytemperováno chemoterapeutikum doxorubicin (pozitivní kontrola – 1 µM DOX) a voda pro buněčné kultury. Po homogenizaci byl zásobní roztok částic (4 mg/ml) a zásobní roztok doxorubicinu (50 mM) naředěn na potřebné koncentrace pomocí vody pro buněčné kultury. Jako negativní kontrola byl pro toto stanovení použit 5% roztok H₂O, který při této koncentraci neovlivňuje proliferaci buněk. Připravené roztoky byly pipetovány o objemu 5 µl na jednu jamku, vše bylo provedeno v hexaplikátu. Takto ovlivněné buňky byly uloženy do inkubátoru.

Samotný XTT test byl proveden po 48 hodinách od ovlivnění buněk.). Po inkubaci bylo do každé jamky, včetně média přidáno 50 µl XTT a ECR směsi. Práce probíhala v laminárním boxu bez zapnutého světla. Po ovlivnění byly destičky umístěny na 1 hodinu do inkubátoru. Po 1 hodině byla měřena absorbance destičky na spektrofotometru Tecan Infinite 200 při vlnové délce 480 nm.

Pro výpočet viability byly z hodnot všech absorbancí hexaplikátu vybrány tři číselné hodnoty, které byly zprůměrovány. Průměrná absorbance každé koncentrace částic a kontrol byla odečtena od průměru absorbance média (blank/pozadí) a vynásobena číselnou hodnotou 100. Tyto průměry byly vztaženy k negativní kontrole (5% H₂O), která představuje 100% viabilitu a byla taktéž odečtená od blanku. Výpočet viability vyjadřuje tato rovnice:

$$viabilita (\%) = \frac{(A_{vz} - A_{blank})}{(A_{5\% H_2O} - A_{blank})} \times 100$$

Obrázek 14: Výpočet viability buněk A549 a A2780.

3.12 Sledování stability chitosanových částic v čase a v kultivačních médiích

Částice pro sledování stability v čase byly skladovány ve vodě a sledovány v časovém intervalu 14 dnů při chladničkové teplotě 4 °C. Velikost, polydisperzní index a zeta potenciál byl měřen po přípravě, po 7 a 14 dnech. Částice ve vodě byly připravovány a měřeny podle postupů v kapitole 3.4 a 3.5.

Stabilita nově připravených částic byla sledována v prostředí kultivačních médií MEM a RPMI v triplicátu. Částice byly připravovány podle kapitoly 3.4. a měřeny podle kapitoly 3.5. Před charakterizací byly částice v médiích zakoncentrovány tak, aby se simulovaly stejné podmínky pipetovaných objemů a koncentrací v experimentu na nádorových liniích.

3.13 Internalizace fluorescenčně značených částic chitosanu do buněk A549

Značené chitosanové částice byly pro tento experiment připraveny a charakterizovány podle podkapitol 2.4.1 a 2.5.3. Pro sledování míry internalizace byla použita buněčná linie A549, která má nízký nukleocytoplazmatický poměr a je tak vhodná pro fluorescenční mikroskopii (Huang et al., 2002). Značené částice z chitosanu byly k buňkám přidávány o koncentracích 50–100–150–200 µg/ml.

Postup:

Buňky A549 byly nasazeny do 2-jamkové kultivační komůrky v množství 100 000 buněk na jamku. Takto připravená komůrka byla daná na 24 hodin do inkubátoru. Před ovlivněním požadovanými koncentracemi částic, bylo vyměněno kultivační médium za čerstvé. Buňky byly ovlivňovány značenými částicemi FITC-CS/TPP o koncentracích 50–100–150–200 µg/ml, doba ovlivnění trvala 3 hodiny v inkubátoru při 37 °C. Následně byly buňky promyty 1x krátce a poté 3x po 5 minutách v PBS při laboratorní teplotě. Poté bylo vyměněno kultivační médium za čerstvé s obsahem fluorescenčního barviva LysoTracker Red DND-99 (TRITC) o koncentraci 100 nM pro obarvení lysozomů, kultivační komůrka byla uložena na 2 hodiny do inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci byly buňky promyty vytemperovaným PBS na 37 °C jednou krátce a následně 3x po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po promytí byly buňky fixovány 4% formaldehydem po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Po fixaci následovalo promytí vzorku 4x v PBS, 1x krátké promytí, poté 3x 5 minut. Buňkám byla

následně obarvena jádra barvivem DAPI o koncentraci 1 µg/1 ml, doba barvení trvala 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po obarvení byl vzorek promyt 4x v PBS, jednou krátce, poté 3x 5 minut při laboratorní teplotě. Takto připravené preparáty byly zamontovány do montovacího média ProLong Gold a skladovány ve tmě. Takto vytvořené fluorescenční preparáty byly pozorovány pomocí badatelského fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 80i vybaveného kamerou Nikon DS-Qi1. Fotografie byly pořízeny pomocí programu NIS-Elements AR 5.11.03.

3.13.1 Zakoncentrování fluorescenčně značených částic pro buněčný experiment

Použitý roztok:

- vzorek submikročástic FITC-CS/TPP o koncentraci 0,25 mg/ml

Postup:

Vzorek s reprezentativními výsledky byl dále zpracován pro zjištění cytotoxicity na nádorových liniích v buněčné laboratoři. Z lékovky byl veškerý objem částic přepipetován do centrifugační tuby s modrým víčkem o objemu 15 ml a centrifugován 5 minut při 1700 g (rcf 1,7). Poté bylo z tuby opatrně odpipetováno 7,5 ml supernatantu. Zbýlých 500 µl bylo lehce promícháno pomocí pipety a přeneseno do 1 ml Eppendorfovy zkumavky. Takto zakoncentrované submikročástice o koncentraci 4 mg/ml CS/TPP v 500 µl byly přeneseny a uloženy do lednice v buněčné laboratoři do druhého dne.

3.14 Statistická analýza

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel 365 (Microsoft, USA) a softwaru GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software, USA). Statistické analýzy byly prováděny na základě experimentů s počtem opakování $n = 3$. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro porovnání dat byl použit nepárový t-test při hladině významnosti 5 %.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Příprava a charakterizace chitosanových částic

Částice z chitosanu, zesítné tripolyfosfátem, se velmi často připravují metodou iontové gelace (Zhang et al., 2024). Příprava chitosanových submikročástic probíhala podle postupu ve studii Rampino et al. Autoři v rámci přípravy částic z chitosanu zesítných tripolyfosfátem použili nízkomolekulární chitosan a optimalizovaný poměr CS:TPP 5:1 (Rampino et al., 2013). Postup přípravy se nachází v kapitole 3.4.

Jejich charakterizace probíhala dle kapitoly 3.5 na analyzátoru HORIBA Scientific SZ-100. Pro každý buněčný experiment byly chitosanové submikročástice čerstvě připraveny (celkem 3x). Výsledné hodnoty DLS, PDI a zeta potenciálu pro jednotlivé experimenty jsou znázorněny v tabulce 2. Byla sledována průměrná hydrodynamická velikost jako „Z-average“ a „mean“. „Z-average“ je intenzitně vážený průměr hydrodynamické velikosti všech měření (Horiba, 2021). „Mean“ představuje aritmetický průměr vztažený ke konkrétní populaci částic (v tabulce 2 znázorněn jako „Peak 1 mean“ a „Peak 2 mean“) (Horiba, 2021). Polydisperzní index (PDI) neboli „disperzita“ se používá k vyhodnocení nerovnoměrnosti distribuce velikostí částic. V rámci měření disperzity byly submikročástice měřeny v „monodisperzním“ a „polydisperzním“ režimu (Chae et al., 2018). Tabulka č. 2 představuje vyhodnocení získaných výsledků.

Tabulka 2: Hodnocení připravených částic CS/TPP v režimu „monodisperzně“ a „polydisperzně“

Měření DLS a Zeta potenciálu NP CS/TPP - čerstvý vzorek							
Monodisperzně			Polydisperzně				Zeta potenciál (mV)
Měření	Z-average (nm)	PDI	Z-average (nm)	PDI	Peak 1 mean (nm)	Peak 2 mean (nm)	
1.	192,9	0,434	192,9	0,434			68,6
2.	196,9	0,337	196,9	0,337			69,4
3.	195,9	0,339	195,9	0,339	53,2	308,7	0,1
4.	198,4	0,294	198,4	0,294			29,4
5.	193,6	0,372	193,6	0,372			66,2
6.	196,0	0,335	196,0	0,335			67,6
7.	195,4	0,345	195,4	0,345	55,5	316,2	70,3
8.	195,1	0,350	195,1	0,350			69,9
9.	193,8	0,361	193,8	0,361			68,1
10.	192,5	0,366	192,5	0,366			69,9
11.	192,1	0,385	192,1	0,385			70,7
12.	195,8	0,327	195,8	0,327	52,3	305,7	70,7
13.	194,6	0,359	194,6	0,359			70,2
14.	194,7	0,358	194,7	0,358			69,9
15.	195,4	0,295	195,4	0,295			72,9
Průměr	195,5	0,343	195,5	0,343	53,7	310,2	69,9
S.D.	1,4	0,021	1,4	0,021	1,7	5,4	1,4

V tabulce č. 2 jsou uvedené měřené parametry částic CS/TPP v 15 opakování, z toho 3 hodnoty (jak pro DLS, PDI a zeta potenciál) nejdál odchylené byly vždy vyřazeny (zvýrazněno červeně). 12 vybraných hodnot bylo zprůměrováno a zároveň byla vypočtena směrodatná odchylka. Pokud bylo více odchylených hodnot, vzorek se označil jako polydisperzní. Pro vyhodnocení monodisperzního vzorku jsme interně zvolili hranici nejvýše 4 měření, které budou vykazovat dvě populace částic (Peak 1 a Peak 2). Nad tuto hranici byly částice hodnoceny jako polydisperzní.

Výsledné hodnoty DLS, PDI a zeta potenciálu připravených chitosanových částic pro jednotlivé buněčné experimenty jsou znázorněny v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Charakterizace CS/TPP pro buněčné experimenty, (počet opakování: 1)

Submikročástice CS/TPP			
Buněčný experiment	Z-average (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
1.	190,3 ± 12,9	0,380 ± 0,056	63,3 ± 1,8
2.	176,1 ± 30,8	0,758 ± 0,163	48,3 ± 4,2
3.	216,2 ± 6,7	0,383 ± 0,038	36,8 ± 1,7

DLS chitosanových submikročástic pro buněčný experiment č. 1 odpovídá velikostnímu rozmezí uváděnému ve studii Rampino et al. (200 ± 24 nm). Zjištěný index polydisperzity byl však vyšší než hodnoty uváděné ve studii Rampino et al. (0,227), což naznačuje širší velikostní rozložení populace částic. Chitosanové částice do PDI 0,3 jsou homogenní (Chae et al., 2018), nad tuto hodnotu mohou tvořit agregáty a být nestabilní (Danaei et al., 2018). Vyšší polydisperzní index může být způsoben variabilitou v průběhu přípravy, například mírnými odchylkami v rychlosti přidávání TPP nebo v homogenitě míchání.

Ve srovnání s chitosanovými submikročásticemi pro buněčný experiment 2 a 3, lze konstatovat, že submikročástice pro experiment č. 1 měly velmi příznivé vlastnosti. Ve druhém experimentu byla dosažena menší hydrodynamická velikost částic ($176,1 \pm 30,8$ nm), ale PDI dosahovalo hodnoty $0,758 \pm 0,163$, což svědčí o výrazné heterogenitě a přítomnosti částic variabilních velikostí a pravděpodobných agregátů. Tato širší distribuce velikostí by mohla ovlivnit následné buněčné experimenty zvýšenou variabilitou výsledků. Naproti tomu v experimentu č. 3 byly připraveny chitosanové submikročástice s větší hydrodynamickou velikostí, ale s nižším PDI podobně jako v experimentu č. 1, čímž bylo dosaženo poměrně homogenní populace (viz. tabulka č. 3).

Z hlediska zeta potenciálu měly submikročástice připravené pro experiment č. 1 nejvyšší hodnotu viz. tabulka č. 3, což predikuje silnou elektrostatickou stabilitu v suspenzi ve srovnání jak s hodnotami Rampino et al. (+24 až +25 mV), tak s vlastními experimenty č. 2 a č. 3. Vyšší zeta potenciál je obecně považován za příznivý, neboť zvyšuje elektrostatickou stabilitu částic a snižuje jejich tendenci agregovat v suspenzi (Dyawanapelly et al., 2016).

Souhrnně lze říct, že submikročástice připravené v rámci experimentu č. 1 nejlépe splňují požadavky na velikost, stabilitu a relativní homogenitu populace submikročástic. Vzhledem k hodnocení „monodisperzního“ a „polydisperzního“ měření, viz. tabulka č. 2 a její popis, submikročástice z chitosanu pro 1. a 2. buněčný experiment byly polydisperzní. Takto připravené chitosanové submikročástice byly použity pro testování jejich cytotoxicity *in vitro* vůči nádorovým liniím A549 a A2780.

Někteří autoři ve svých studiích, například Des Bouillons-Gamboa et al., porovnávali několik stechiometrických poměrů CS:TPP (6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1) a uvedli, že poměr 4:1 představuje nejstabilnější systém částic. DLS částic vykazovalo 195 ± 5 nm, PDI 0,528 a zeta potenciál 51 ± 1 mV, což je v porovnání s výsledky submikročástic této diplomové práce obdobné (viz. tabulka č.3). Autoři dále uvádějí, že vyšší poměr CS:TPP 5:1 sice vykazoval

vyšší povrchový náboj, ale větší velikost a PDI částic snížila jejich homogenitu. DLS částic z chitosanu představovala 205 ± 12 nm, PDI 0,558 a zeta potenciál 53 ± 1 mV. V porovnání s parametry této diplomové práce jsou výsledné hodnoty podobné, PDI je v obou hmotnostních poměrech (4:1 a 5:1) velmi vysoké oproti PDI submikročásteč pro buněčný experiment č. 1 a 3, viz tabulka č. 2. Na druhou stranu zeta potenciál buněčného experimentu č. 3 je značně snížen oproti hodnotám částic z chitosanu v studii Des Bouillons-Gamboa et al. (Des Bouillons-Gamboa et al., 2024).

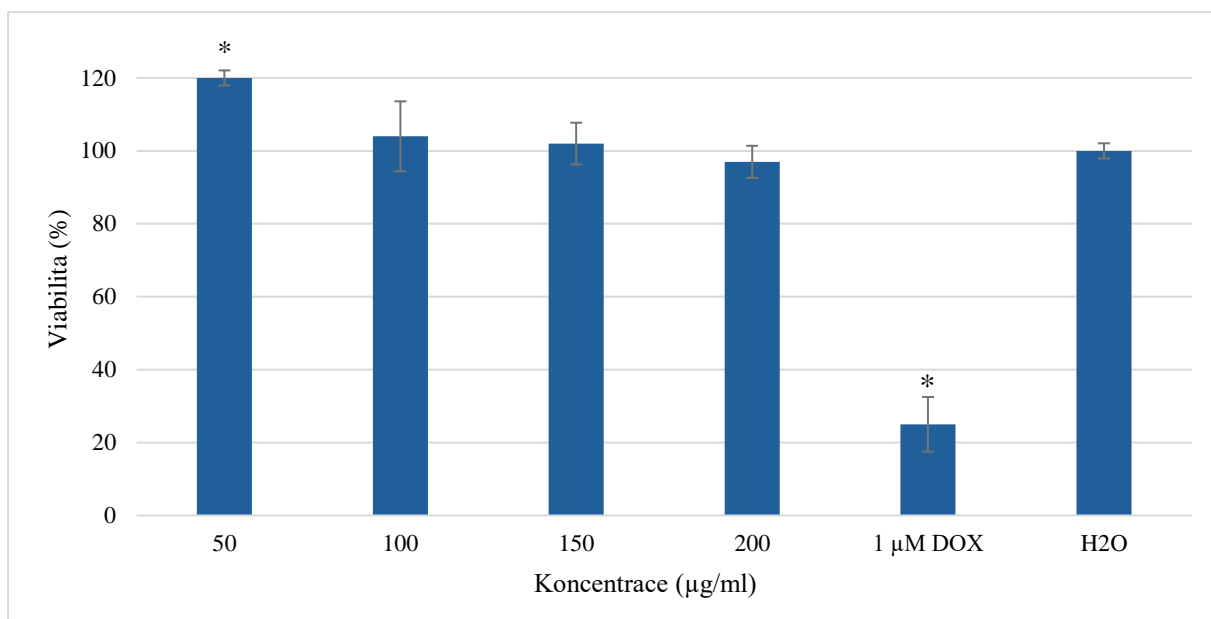
4.2 Stanovení cytotoxicity chitosanových částic pomocí testu XTT

Viabilita buněk A549 a A2780 byla stanovena pomocí XTT testu. Pro každou testovanou koncentraci částic a buněčnou linii byla měření provedena ve třech nezávislých opakováních. Získaná data byla následně sloučena a na jejich základě byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty byly znázorněny graficky, přičemž chybové úsečky představují směrodatnou odchylku. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí nepárového t-testu při hladině významnosti 5 % prostřednictvím softwaru GraphPad QuickCalcs. Statisticky významné rozdíly byly označeny hvězdičkou.

4.2.1 Buněčná linie A549

Graf č. 1 znázorňuje vliv chitosanových submikročásteč na viabilitu buněk A549. U nejnižší koncentrace (50 $\mu\text{g/ml}$) došlo k statisticky významnému zvýšení viability, při této koncentraci částic došlo k zvýšení viability na 120 %. U koncentrací částic 100 $\mu\text{g/ml}$ 150 $\mu\text{g/ml}$ pak došlo k statisticky nevýznamnému zvýšení viability. Naopak u koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$, byla viabilita nepatrně snižena na 97 %.

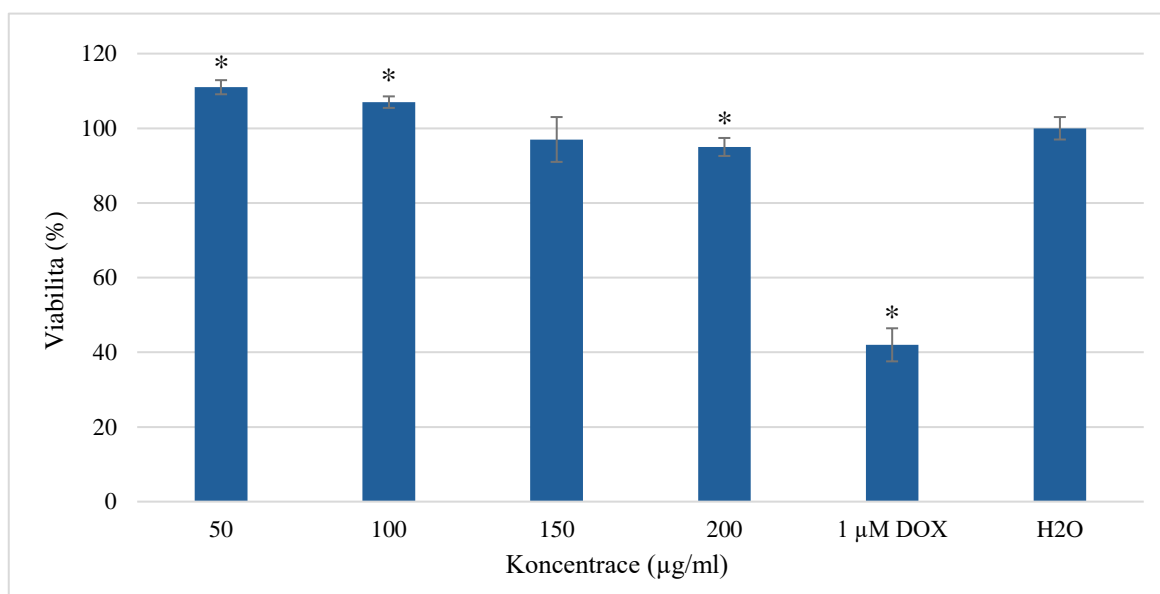
Graf 1: Vliv chitosanových částic na viabilitu buněčné linie A549. Výsledky vztaženy k negativní kontrole (H₂O). Symbol * značí statisticky významný rozdíl vůči kontrole na hladině významnosti $p \leq 0,05$.



4.2.2 Buněčná linie A2780

Graf č. 2 znázorňuje vliv chitosanových submikročásteček na viabilitu buněčné linie A780. U koncentrací 50, 100 µg/ml lze pozorovat statisticky významný nárůst viability. Naopak statisticky významný pokles viability lze pozorovat u koncentrace submikročásteček 200 µg/ml, kdy hodnota viability klesla na 95 %.

Graf 2: Vliv chitosanových částic na viabilitu buněčné linie A2780. Výsledky vztaženy k negativní kontrole (H₂O). Symbol * značí statisticky významný rozdíl vůči kontrole na hladině významnosti $p \leq 0,05$.



4.2.3 Hodnocení cytotoxicity chitosanových částic

Vzhledem k rostoucímu zájmu o využití chitosanových částic se testováním jejich cytotoxicity zabývá mnoho studií.

Ve studii Costa et al. (2023) autoři testovali chitosanové submikročástice v koncentračním rozsahu od 0,5–7 mg/ml vůči linii keratinocytů HaCat s využitím testu XTT. Autoři Costa et al. uvádějí, že koncentrace submikročástic do 5 mg/ml nevykazovaly statisticky významný pokles viability buněk. Životaschopnost keratinocytů činila do 5 mg/ml 100 %, naopak viabilita buněk o koncentraci 7 mg/ml byla statisticky zvýšená na 120 %. Ve srovnání s touto diplomovou prací linie A549 taktéž vykazovala viabilitu 120 %, ale při nejnižší koncentraci (50 µg/ml), viz. graf č. 1. Studie Costa et al. a tato diplomová práce ukazuje na biokompatibilitu a netoxičnost chitosanových nosičů. Vzhledem k použitými jinými buněčnými liniemi a koncentracemi nelze studii Costa et al. a tuto diplomovou práci přímo srovnávat. Autoři Costa et al. použili jiné buněčné linie nekarcinogenního typu, které mohou být méně senzitivní a vyžadují proto větších koncentrací, oproti této diplomové práci zabývající se nádorovými liniemi. Dalším možným důvodem variability výsledků může být velikost použitých částic z chitosanu, neboť částice s menší velikostí vykazují vyšší cytotoxický účinek oproti větším. V této diplomové práci byly použity submikročástice o velikosti 190–216 nm

(viz. tabulka č. 2), Costa et al. použili submikročástice o velikosti 226 nm. Ve druhé studii Radwan-Pragłowska et al. (2020) byly vyvinuty hybridní nanovláknenné skafoldy složené z nanovláken polykaprolaktonu a povrchové vrstvy acylovaného chitosanu. Tyto skafoldy byly funkcionalizovány nanočásticemi ZnO, Fe₃O₄ a Au. Na rozdíl od této diplomové práce nebyly skafoldy aplikovány ve formě disperze submikročástic, ale jako pevné struktury, na které byly nasazeny buňky. Interakce buněk se skafoldem tedy probíhala především na úrovni adheze k povrchu materiálu, nikoli prostřednictvím přímého kontaktu s volně dispergovanými submikročásticemi v médiu. Biokompatibilita byla hodnocena na fibroblastových liniích L929 a primárních lidských dermálních fibroblastech prostřednictvím testu XTT. Výsledky studie Radwan-Pragłowska et al. ukázaly, že připravené skafoldy nebyly toxické a podporovaly buněčnou proliferaci. Nejvýraznější zvýšení viability bylo pozorováno u skafoldů obsahujících zlaté nanočástice, kdy viabilita dosáhla až 145 % u L929 a 139 % u lidských dermálních fibroblastů. Vyšší proliferační efekt ve studii Radwan-Pragłowska et al. může souviset s přítomností bioaktivních nanočástic zlata, které podporují proliferaci a regeneraci tkání. Naproti tomu chitosanové submikročástice testované v této diplomové práci neobsahovaly žádné kovové složky, a přesto vykazovaly zvýšenou viabilitu buněk, zejména při nižších koncentracích (viz. graf č.1 a2). Diplomovou práci nelze přímo srovnávat se studii Radwan-Pragłowska et al., neboť použili nenádorové buněčné systémy, chitosan nebyl použit ve formě disperze submikročástic, ale pouze jako povrchová vrstva skafoldů. Zároveň autoři Radwan-Pragłowska et al. neuvedli koncentrace chitosanu a nanočástic kovů v koncentračních jednotkách, ale srovnávali viabilitu buněk mezi různými skupinami testovaných skafoldů. Na druhou stranu obě práce shrnují netoxičnost, biokompatibilitu a adhezivitu chitosanu vůči buňkám. Studie Radwan-Pragłowska et al. zároveň poukazuje na využití chitosanu v tkáňovém inženýrství.

Ve srovnání s touto diplomovou prací, kde byly testovány chitosanové submikročástice bez enkapsulovaného léčiva vůči linii A2780, ve studii Ozturk et al. (2025) připravili lipid-chitosanové hybridní nanočástice se zapouzdřenými cytostatiky paklitaxel a nitidin. Cílem studie bylo překonat multirezistenci nádorové linie A2780/PTX (paklitaxel). Ve studii Ozturk et al. byla nádorová linie ovlivněna nanočásticemi chitosanu obsahující paklitaxel o koncentraci 50 nM a nitidinu o koncentraci 100 μM. Tyto nanočástice vedly ke snížení viability A2780/PTX buněk až na 41 %. Oproti této diplomové práci nebylo žádné léčivo enkapsulováno v chitosanových submikročásticích, a tak viabilita buněk A2780 odrážela výhradně vlastnosti

samotného nosiče (viz. graf č. 2). Tento rozdíl podtrhuje zásadní význam ve složení a funkcionalizaci částic. Zatímco částice bez zapouzdřeného léčiva vykazují biokompatibilitu a potenciál pro bezpečné doručování léčiv, částice obsahující aktivní látky podporují cíleně snížit viabilitu i u buněčných populací vykazujících lékovou rezistenci. Studie Ozturk et al. tak demonstruje kombinovanou léčbu, v němž nanočástice chitosanu neplní pouze roli nosiče, ale přispívá ke zvýšení terapeutické účinnosti v oblasti nádorových onemocnění.

Další studie, Slováková et al. (2024), se zaměřila na využití submikročásteček chitosanu o nízké MW o DD 95 % jako vakcinační systém pro intranasální podání proti myšímu cytomegaloviru. Cílem jejich studie bylo ověřit, zda chitosanové submikročástečky se zapouzdřeným glykoproteinem B myšího cytomegaloviru dokážou vyvolat specifickou humorální a buněčnou imunitní odpověď. K *in vitro* stanovení viability použili test kvantifikace ATP na buněčné myší monocyto-makrofágové linii J774.1. Chitosanové submikročástečky byly k makrofágové linii přidány v koncentracích 0,5–5 mg/ml. Žádná z koncentrací nevykazovala cytotoxický účinek vůči buněčné linii. Statisticky významný pokles byl hodnocen při nejvyšší koncentraci 5 mg/ml, viabilita však neklesla výrazně oproti negativní kontrole (100 %). Výsledky viability v této diplomové práci jsou velmi obdobné jako hodnoty publikované ve studii Slováková et al., i přes skutečnost, že v rámci této diplomové práce byly využity mnohonásobně nižší koncentrace chitosanu (max 200 µg/ml) a odlišný buněčný systém. Z tohoto zjištění a porovnání můžeme usuzovat, že i přes odlišnost porovnávaných buněčných linií, ani vyšší koncentrace (mg/ml) chitosanových submikročásteček nevykazují toxicitu a jsou biokompatibilní. Zároveň studie Slováková et al. demonstruje využití chitosanových submikročásteček v rámci vakcinačního systému k intranasálnímu podání.

Viabilitu buněk, po ovlivnění chitosanovými submikročástečkami s navázanou fluorescenční barvičkou FITC, testovala studie Jiang et al. (2017). Cytotoxicita submikročásteček byla testována testem MTT vůči myší makrofágové linii RAW 264.7. Viabilita buněk byla hodnocena při koncentracích 5–500 µg/ml ve třech časových intervalech: po 12, 24 a 36 hodinách expozice. V žádném časovém bodě a koncentraci nebyla zaznamenána cytotoxicita makrofágových buněk, viabilita zůstávala blízko 100 %. To dokládá, že ani dlouhodobější kontakt buněk s chitosanovými submikročástečkami, v tomto případě i s navázaným FITC, nevede k jejím poškození. Tato diplomová práce hodnotila viabilitu po 48 hodinách expozice. Makrofágy, ve studii Jiang et al., při koncentracích 25–50–100 µg/ml vykazovaly nejvyšší

viabilitu cca 120 %, což je srovnatelné s výsledkem nádorové linie A549 této diplomové práce, která vykazovala totožnou hodnotu 120 % při nejnižší koncentraci 50 µg/ml.

Studie Dyawanapelly et al. (2016) hodnotila cytotoxicitu submikročásteček na bázi PLGA, jejichž povrch byl modifikovaný chitosanovými submikročástečkami. Viabilita byla hodnocena vůči adenokarcinomu plic A549 testem MTT. Nádorové buňky byly ovlivněny submikročástečkami o koncentracích 0,25–2 mg/ml, životaschopnost byla měřena po 24 a 48 hodinách inkubace. Z výsledků jejich studie se ukázalo, že submikročástečky na bázi PLGA vykazovaly viabilitu kolem 90 % při nejvyšší koncentraci oproti submikročástečkami bez chitosanu. V této diplomové práci byly testovány chitosanové submikročástečky na stejném buněčném modelu, přičemž buňky byly rovněž inkubovány po dobu 48 hodin. Při koncentracích 50–200 µg/ml nebyl pozorován žádný cytotoxický efekt a viabilita se pohybovala oproti studii Dyawanapelly et al. nad 97 % a výš (viz. grafy 1 a 2). Je tak možné, že stanovení cytotoxicity vůči buňkám A549 v této diplomové práci mohou vykazovat 90% viabilitu i při koncentraci 2 mg/ml. Obě studie potvrzují, že chitosanové submikročástečky, ať už jako samotné nosiče nebo v kombinaci s polymerním s PLGA, vykazují vysokou biokompatibilitu a jsou vhodné pro další farmaceutické nebo terapeutické využití.

Zajímavé poznatky o cytotoxicitě chitosanových submikročásteček přinesla studie Jesus et al. Testovali chitosanové submikročástečky o DD 80 % a 93 % na makrofágové linii RAW 264.7 a mononukleárních buňkách izolovaných z krve (PBMCs). Autoři Jesus et al. použili koncentrace chitosanových submikročásteček v rozsahu 0,5–5 mg/ml. Chitosanové submikročástečky o DD 80 % způsobily snížení viability makrofágů pod 70 % při koncentraci 2,5 mg/ml, submikročástečky o DD 93 % snížily viabilitu buněk pod 70 % při koncentraci 4,5 mg/ml. Oproti tomu životaschopnost mononukleárních buněk pod 50 % byla snížena již při nejnižší koncentraci prostřednictvím submikročásteček o DD 80 %, chitosanové submikročástečky o DD 93 % snížily viabilitu při nejvyšší koncentraci. V této diplomové práci byly použity chitosanové submikročástečky o DD 75–85 %, což koreluje s prací Jesus et al., nicméně testované koncentrace submikročásteček byly mnohem nižší a nevyvolaly cytotoxicitu. Navzdory tomu, viabilita nebyla stanovena vůči buňkám RAW 264.7 a PBMCs, ale A549 a A2780. Snížení viability ve studii Jesus et al. může souviset s velikostí submikročásteček. Chitosanové submikročástečky o DD 80 % disponovaly velikostí 127 nm, nižší velikost tak mohla vést toxicitě (Parde-Schrepler et al., 2017). Submikročástečky o DD 93 % a velikostí 293 nm mohly snížit viabilitu buněk prostřednictvím vyššího stupně deacetylace, protože vyšší velikosti částic

obecně působí méně toxicky (Parde-Schrepler et al., 2017). Na druhou stranu studie Slováková et al. ukázala, že makrofágy J774.1 vykazovaly životaschopnost 100 % i při nejvyšší koncentraci chitosanových submikročásteček (5 mg/ml) o DD 95 %. Z toho vyplývá, že mononukleární buňky izolované z krve jsou na chitosanové submikročástečky velmi citlivé při různých velikostech a DD. Pro hlubší pochopení cytotoxicity těchto submikročásteček je potřeba rozsáhlejší studie s použitím primárních buněk.

4.3 Hodnocení internalizace chitosanových částic do buněk A549

Internalizace částic do buněk je klíčová pro efektivní doručení léčiv či jiných bioaktivních látek. Umožňuje transport na místo účinku, zvyšuje terapeutickou účinnost a snižuje systémovou toxicitu. Významným faktorem ovlivňujícím buněčný příjem je povrchový náboj částic. Chitosanové částice nesou pozitivní zeta potenciál, který podporuje jejich absorpci k negativně nabitému povrchu buněčné membrány a usnadňuje tak internalizaci do buněk vůči negativně nabitým částicím (Pathak et al., 2023). Čím vyšší kladný zeta potenciál vykazují chitosanové částice, tím intenzivnější je jejich elektrostatická interakce s negativně nabitou buněčnou membránou, což vede k efektivnější internalizaci (Dyawanapelly et al., 2016). Částice o různých velikostech jsou do buněk internalizovány odlišným mechanismem endocytózy. Větší částice jsou obecně méně internalizovány do buněk oproti menším. Na druhou stranu částice jsou efektivně internalizovány prostřednictvím fagocytárních buněk oproti nádorovým (Jiang et al., 2017, Pathak et al., 2023).

Dalším způsobem hodnocení cytotoxicity částic je studium jejich interakce s buněčnou kulturou. V následujícím experimentu byly připraveny submikročástečky z chitosanu značené FITC podle postupu v kapitole 3.5 a sledovala se míra internalizace těchto submikročásteček v rozmezí koncentrací 50–100–150–200 $\mu\text{g/ml}$ s buněčnou linií A549 při laboratorní teplotě.

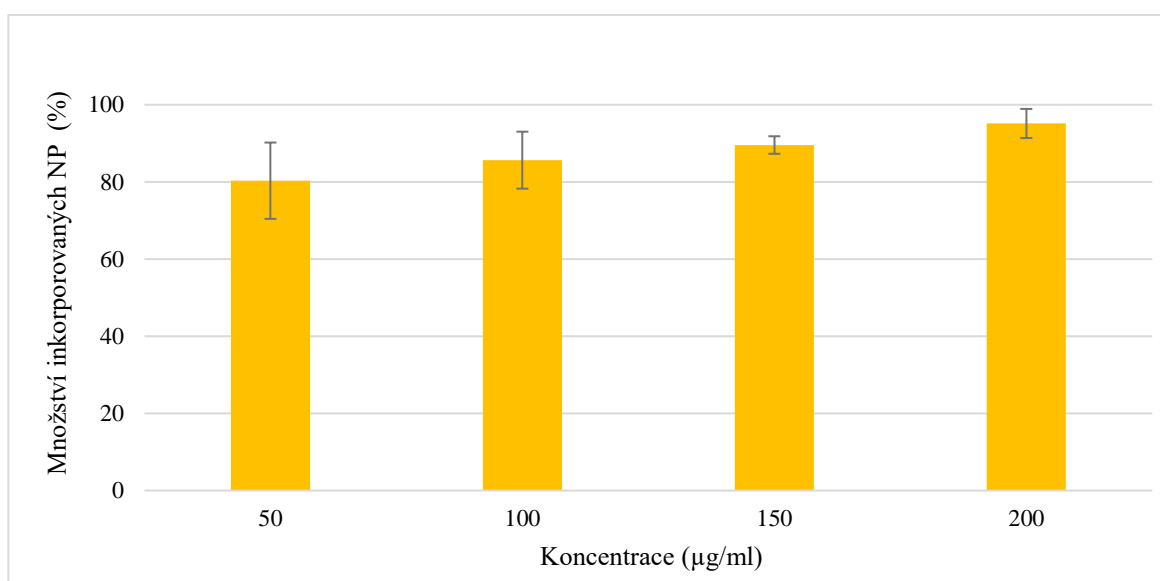
V tabulce č. 4 lze nalézt základní fyzikálně-chemické parametry chitosanových submikročásteček značených FITC. Graf č. 3 znázorňuje procentuální internalizaci chitosanových submikročásteček do buněk A549. Žluté sloupce reprezentují průměrné hodnoty podílů internalizovaných submikročásteček pro čtyři různé koncentrace, horní úsečky značí směrodatnou odchylku. V grafu č. 3 lze vidět rostoucí trend: s rostoucí koncentrací dochází k vyšší míře internalizace částic do buněk. Koncentrační závislost je také zobrazena na obr. č. 15 A–H. Tento

trend naznačuje, že buňky A549 mají schopnost procentuálně inkorporovat větší množství částic při vyšších koncentracích.

Tabulka 4: Submikročástice FITC-CS/TPP a jejich DLS, PDI a zeta potenciál

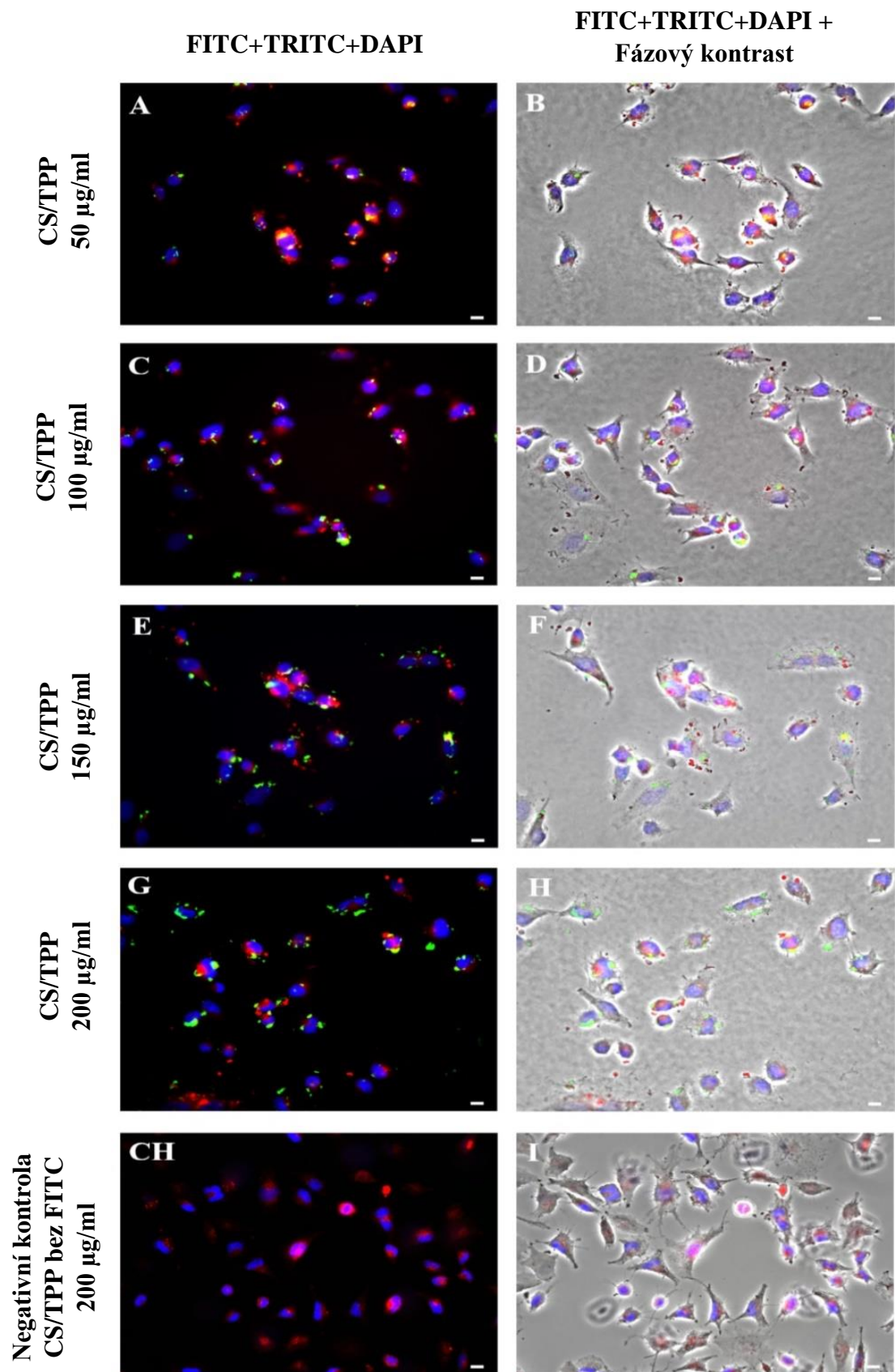
Submikročástice	Z-average (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
FITC-CS/TPP	164,4 ± 7,3	0,369 ± 0,079	54,3 ± 2,3

Graf 3: Procentuální množství inkorporovaných částic do buněk A549



Na obr. č. 15 A–H jsou znázorněny FITC-CS/TPP o koncentracích 50–200 µg/ml v buňkách A549. Buňky s chitosanovými submikročásticemi byly vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie, kde byly submikročástice detekovány jako zeleně fluoreskující (signál FITC) signály uvnitř cytoplazmy. Pro přesnější určení jejich intracelulární polohy byla využita kombinace fluorescenčního zobrazení a fázového kontrastu, která umožnila identifikaci buněčných kontur a přesnější lokalizaci částic v buňkách. Jádra buněk byla barvena fluorescenčním barvivem DAPI (modrá fluorescence) a lysozomy byly vizualizovány pomocí LysoTrackeru DND-99 (červená fluorescence – TRITC). To dále umožnilo sledovat kolokalizaci částic s lysozomálními strukturami. Překrytím červeného signálu TRIC se zeleným signálem FITC vzniká žlutý signál. Tato změna fluorescence znamená, že chitosanové

submikročástice byly po internalizaci transportovány do endolysozomálního kompartmentu. Obrázek 15 CH–I pak představuje negativní kontrolu, kterou představovaly neznačené částice CS/TPP o koncentraci 200 µg/ml. Buňky s částicemi byly počítány minimálně na 100 buněk.



Obrázek 15: Fluorescenční zobrazení částic CS/TPP v buňkách A549. CS/TPP 50 µg/ml (**A, B**), CS/TPP 100 µg/ml (**C, D**), CS/TPP 150 µg/ml (**E, F**), CS/TPP 200 µg/ml (**G, H**), negativní kontrola CS/TPP bez FITC 200 µg/ml (**CH, I**). Měřítko 10 µm.

Ve studii Huang a kol. byla prokázána internalizace FITC-CS/TPP submikročástic o velikosti $194,7 \pm 1,6$ nm a zeta potenciálu $+35,5 \pm 3,1$ mV do buněk A549 prostřednictvím klatrin-dependentní endocytózy. Tento proces byl závislý na koncentraci, čase i teplotě, přičemž nejvyšší příjem nastal po 4 hodinách při 37 °C. Naopak při 4 °C došlo ke snížení příjmu o více než 80 % vlivem zastavení metabolické aktivity buněk. Internalizace byla kvantifikována absolutně ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteinu), čímž vypočetli kinetické parametry ($V_{\text{max}} = 58,14 \mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$; $K_m = 3,84 \mu\text{M}$). V této diplomové práci byly použity submikročástice FITC-CS/TPP s mírně menší velikostí, vyšším zeta potenciálem a hodnotou PDI, jak ukazuje tabulka č. 4. Internalizace v této diplomové práci byla sledována po 3 hodinách inkubace a kvantifikována jako procentuální podíl z celkově přidané dávky. Graf č. 3 ukazuje koncentrační závislost – při 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bylo procentuálně internalizováno 80 % submikročástic, zatímco při 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 95 %, což svědčí o velmi účinné internalizaci. Na rozdíl od absolutní kvantifikace ve studii Huang et al., použití procentuálního přístupu umožňuje přímé srovnání efektivity mezi dávkami. Oba přístupy jsou komplementární a potvrzují, že částice CS/TPP se efektivně internalizují do buněk A549 bez známek cytotoxicity. Vzhledem k předchozím poznatkům Huang et al., lze předpokládat, že i v této diplomové práci chitosanové submikročástice se mohou internalizovat do buněk prostřednictvím klatrin-dependentní endocytózy (viz. tabulka č. 4).

Ve studii Slováková et al (2024). byla sledována internalizace FITC-CS/TPP u myší makrofágové linie J774.1 pomocí konfokální mikroskopie a průtokové cytometrie. Submikročástice byly k buňkám přidávány v koncentracích 62,5–500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o velikosti $221,0 \pm 46,61$ nm, PDI 0,52 a zeta potenciálu $+41,69$ mV. Výsledky jejich studie byly vyjádřeny jako procento buněk s pozitivním fluorescenčním signálem, tedy jako podíl buněk, které částice pohltily. Při nejvyšší testované koncentraci (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vykazovalo až 42 % buněk pozitivní signál, což svědčí o účinném a rychlém vstupu částic do buněk pravděpodobně prostřednictvím fagocytózy. Tato metoda internalizace ukazuje, kolik buněk na částice reaguje, ale neumožňuje určit, kolik částic bylo skutečně přijato nebo jaký podíl z celkového množství částic byl internalizován. V této diplomové práci byla zvolena metoda kvantifikace, která vyjadřuje procentuální účinnost buněčného příjmu vzhledem k aplikované dávce částic, viz graf č. 4. Výsledky obou studií není možné přímo srovnávat. Velikost (tabulka č. 4), koncentrace (graf č. 3) a buněčná linie (viz. v textu výše) byly odlišné. Oba přístupy však poskytují cenné a vzájemně se doplňující informace, které potvrzují, že chitosanové submikročástice se

efektivně internalizují jak do imunitních, tak do epitelálních buněk. To z nich činí univerzální a biokompatibilní platformu pro intracelulární transport.

Podobně, jako ve studii Slováková et al. (2024), byly submikročástice FITC-CS/TPP testovány na makrofágových liniích J774.1, studie Jiang et al. (2017). tyto částice testovala vůči makrofágům RAW 264.7. Jiang et al. připravili submikročástice o velikost $256,6 \pm 52,6$ nm, PDI $0,24 \pm 0,03$ a zeta potenciálu $19,13 \pm 0,45$ mV. K makrofágovým buňkám byly přidány v širokém rozmezí koncentrací: 25–750 $\mu\text{g/ml}$. Internalizace submikročástic byla kvantifikována na základě fluorescenční intenzity v buněčných lyzátech po inkubaci po dobu 1, 2, 4 a 6 hodin. Výsledky jejich studie ukázaly, že fluorescenční signál rostl v závislosti na čase a koncentraci. Největší nárůst signálu zaznamenali mezi 1. a 4. hodinou, zatímco mezi 4. a 6. hodinou docházelo k postupnému nasycení buněčného příjmu při koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$. Přesná procenta internalizace autoři neuvádějí. V této diplomové práci byly submikročástice FITC-CS/TPP přidány k buňkám A549 do maximální koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ (viz. graf č.3) a velikosti $164,4 \pm 7,3$ nm (viz. tabulka č.4). Chitosanové submikročástice byly inkubovány po dobu 48 hodin, tedy výrazně delší čas než ve studii Jiang et al. Internalizace byla kvantifikována jako procentuální podíl internalizovaných submikročástic z celkové podané dávky. Autoři Jiang et al. hodnotili internalizaci částic pomocí relativní fluorescenční intenzity bez určení, jaký podíl podaných částic byl skutečně přijat. Vzhledem k tomu, že tato diplomové práce a studie Jiang et al. použily rozdílnou metodiku, buněčné modely, velikost submikročástic, jejich koncentrace a čas inkubace, lze výsledky chápat jako potvrzující efektivní příjem částic FITC- CS/TPP (Jiang et al., 2017).

4.4 Stabilita chitosanových částic v čase

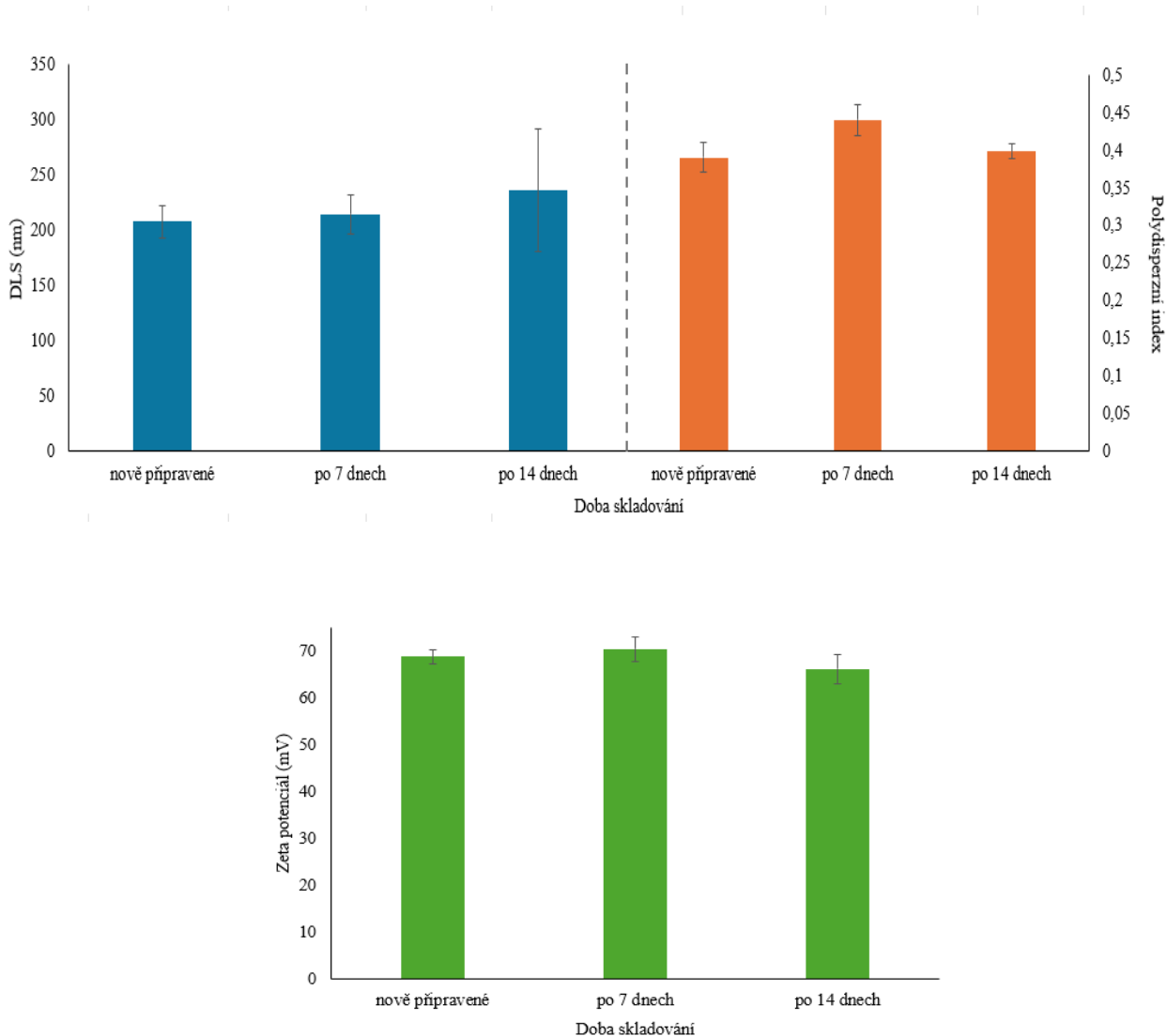
Sledování stability skladovaných chitosanových submikročástic je klíčové pro zajištění jejich fyzikálně-chemických vlastností, účinnosti jako nosičového systému a reprodukovatelnosti výsledků. V této diplomové práci byly chitosanové submikročástice skladovány v deionizované vodě po dobu 14 dnů při teplotě 4 °C. Stabilita částic byla hodnocena s ohledem na změny jejich velikosti, polydisperzního indexu, a zeta potenciálu, které jsou zásadními ukazateli jejich stability. Skladování v deionizované vodě při nízké teplotě bylo zvoleno s cílem minimalizovat rychlost degradace chitosanových submikročástic. Přestože nízká teplota může zpomalit degradační procesy, submikročástice mohou během skladování podléhat agregaci, což ovlivňuje jejich funkčnost a schopnost interagovat s buňkami. Testování stability tak poskytuje důležité informace o vhodnosti zvolených skladovacích podmínek a o jejich vlivu na chování submikročástic v biologických systémech.

Submikročástice z chitosanu byly připravovány a přednostně hned zpracovány v buněčných experimentech, další, nově připravené submikročástice byly použity pro ověření stability jejich parametrů v čase. Výsledné hodnoty chitosanových submikročástic skladovaných v čase představuje tabulka č. 5, sledování stability v průběhu 14 dní lze pak vidět v grafu č. 4.

Tabulka 5: Stabilita skladovaných submikročástic CS/TPP v čase (počet opakování: 2)

Doba skladování	Z-average (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
nově připravené	207,4 ± 14,50	0,390 ± 0,02	68,9 ± 1,41
po 7 dnech	214,5 ± 17,54	0,440 ± 0,02	70,5 ± 2,69
po 14 dnech	235,9 ± 55,44	0,398 ± 0,01	66,25 ± 3,04

Graf 4: Stabilita skladovaných submikročástic CS/TPP v čase, (počet opakování:2)



V této diplomové práci byly změny sledovaných parametrů méně výrazné. Hodnota polydispersního indexu zůstala během celé doby skladování v rozmezí 0,390–0,440. Velikost částic vzrostla z $207,4 \pm 14,50$ nm na $235,9 \pm 55,44$ nm, avšak bez známek agregace. Zeta potenciál během 14 dní se pohyboval v rozmezí $66,25 \pm 3,04$ mV až $70,5 \pm 2,69$ mV (viz. tabulka č. 5). Stabilitu připravených submikročástic CS/TPP lze porovnat se studií Slovákova et al. (2024). Z výsledků jejich studie bylo patrné, že velikost nově připravených submikročástic přesahovala cca 230–240 nm, po 14 dnech byla mírně snížena. Po dvou týdnech skladování nebyly submikročástice výrazně zvětšeny, zeta potenciál autoři nehodnotili. PDI po přípravě vykazovalo hodnotu 0,4, po 14 dnech skladování byl zaznamenán nárůst PDI na 0,6.

Došlo tak ke snížení uniformity částic a k možné snížené stabilitě. Z těchto důvodů autoři upřednostnili čerstvou přípravu částic pro biologické aplikace. Oproti výsledkům této diplomové práce, viz. tabulka č. 5 a graf č. 4, jsou chitosanové submikročástice skladovány během 14 dnů stabilnější, nicméně jejich velikost po 14 dnech je variabilní s ohledem na směrodatnou odchylku.

V další studii Rampino et al. (2013) sledovali stabilitu chitosanových submikročástic ve vodné suspenzi po dobu 28 dní při laboratorní teplotě. K přípravě byly použity chitosanové submikročástice o velmi nízké a nízké molekulové hmotnosti. Částice připravené z chitosanu o nízké MW měly velikost 200 ± 24 nm, PDI 0,227 a zeta potenciál $+25 \pm 3$ mV. Chitosanové submikročástice o velmi nízké MW měly velikost 151 ± 10 nm, PDI 0,185 a zeta potenciál 24 ± 4 mV. Rampino et al. uvádějí, že velikost submikročástic o nízké molekulové hmotnosti se během 28 dnů zvýšila o 8 % na 216 nm, zatímco velikost chitosanových submikročástic o velmi nízké molekulové hmotnosti se zvýšila o 24 % na 248 nm. Stejní autoři dále uvádějí, že velikost submikročástic za stálého míchání na míchadle po 24 hodinách se zvýšila o 77 % (354 nm) a PDI vzrostlo na hodnotu 0,341. Velikost submikročástic uchovávaných bez míchání vzrostla o 5 % (210 nm) a PDI si zachovalo hodnotu 0,186. Výsledky v této diplomové práci, uvedené v tabulce 5 a grafu 4 uvádějí, že skladování při chladničkové teplotě bez míchání na míchadle napomáhá k udržení jejich velikosti a uniformity. Nicméně Rampino et al. ukazují, že chitosanové submikročástice mohou být stabilní i při laboratorní teplotě po dobu 28 dnů, čímž taky ukazuje na jejich lepší stabilitu. V této diplomové práci byly rovněž použity chitosanové submikročástice o nízké molekulové hmotnosti s obdobnými parametry, které jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Studie Romić et al. (2019) sledovala stabilitu chitosanových mikročástic s enkapsulovaným melatoninem po dobu šesti měsíců při teplotách 5°C a 25°C . Průměrná velikost mikročástic se během sledovaného období při obou teplotách výrazně neměnila a zůstávala v rozmezí 2,4–2,8 μm . Zeta potenciál se při 25°C snížil z $29,0 \pm 2,0$ mV na $23,0 \pm 0,5$ mV, zatímco při 5°C poklesl na $25,3 \pm 1,0$ mV. I po půl roce si tak mikročástice uchovávaly relativně vysoký kladný povrchový náboj, což nasvědčuje jejich stabilitě. Polydisperzní index v této studii autoři neuváděli. Výsledné parametry částic v této diplomové práci ukázaly zvýšený nárůst velikosti a zeta potenciál zůstal vysoký po celou dobu skladování, což svědčí o zachované elektrostatické stabilitě submikročástic jako v práci Romić et al. Tuto diplomovou práci nelze přímo srovnávat se studií Romić et al., protože sledovali stabilitu mikročástic po

delší časové období, které navíc dosahovaly velikosti přes 2 μm . V této diplomové práci submikročástice disponovaly odlišnými parametry DLS a zeta potenciálu, viz. tabulka č. 5 a graf č. 4. Vzhledem k mikrometrovým velikostem chitosanu v práci Romić et al., lze říct, že jsou stabilnější než submikrometrové po dlouho dobu skladování.

Částice CS/TPP v této diplomové práci jsou nejlépe stabilní jako nově připravené a po 7 dnech skladování. Po 14 dnech je jejich velikost vzhledem k směrodatné odchylce vysoce variabilní, PDI a zeta potenciál se v časovém období výrazně nezměnil. Vzhledem k variabilní velikosti chitosanových submikročástic a konstantních parametrů PDI a zeta potenciálu, mohou vykazovat stabilitu a účinnost jako nosiče léčiv i po 14 dnech skladování.

4.5 Stabilita chitosanových částic v kultivačních médiích

Analýza fyzikálně-chemických parametrů chitosanových submikročástic po jejich vložení do kultivačního média je důležitá z hlediska posouzení jejich stability a chování v biologickém prostředí. Zatímco submikročástice mohou vykazovat stabilní velikost, náboj i distribuci v deionizované vodě i po určité době skladování (viz. kapitola 4.4.), po přidání do komplexního kultivačního média dochází k interakcím s proteiny, solnými ionty dalšími biomolekulami. Tyto interakce mohou vést k významným změnám fyzikálně-chemických vlastností submikročástic, jako je nárůst velikosti (např. agregace), změna zeta potenciálu, či tvorba tzv. „proteinové koróny“, která mění povrchové vlastnosti částic (Pathak et al., 2023). Ačkoli *in vitro* podmínky poskytují základní přehled o interakcích mezi částicemi s buňkami, přesto neodrážejí složitost *in vivo* prostředí. Z těchto důvodů je testování stability chitosanových submikročástic v kultivačních médiích důležitým krokem, který pomáhá odhadnout, jak se budou chovat v náročnějších biologických podmínkách (Strojan et al., 2017).

V této diplomové práci submikročástice CS/TPP odpovídaly DD 75–85 % a byly měřeny v po přípravě v deionizované vodě a poté v MEM a RPMI médiích při laboratorní teplotě. Submikročástice měřené po přípravě byly stabilní a monodisperzní. Po vložení do kultivačních médií došlo k nestabilitě a agregaci chitosanových částic vlivem proteinů a iontů, viz. tabulka č. 6.

Tabulka 6: Stabilita submikročástic CS/TPP v kultivačních médiích (počet opakování: voda 3, média 2)

Prostředí submikročástic	Z-average (nm)	PDI	Zeta potenciál (mV)
deionizovaná H ₂ O	194,3 ± 14,8	0,382 ± 0,017	57,4 ± 15,4
MEM	23,3 ± 5,2	0,650 ± 0,047	0,0 ± 0,0
RPMI	1487,1 ± 1256	2,255 ± 0,187	-0,1 ± 0,1

Studie Jesus et al. (2020) sledovala koloidní stabilitu chitosanových submikročástic CS/TPP v kultivačních médiích (DMEM a RPMI) při teplotě 37 °C. Částice z chitosanu s různým stupněm deacetylace: CSNPs 80%, CSNPs 93%, byly skladovány a měřeny po 1 a 24 hodinách. Velikost submikročástic CSNPs 80% po přípravě byla 127 ± 5 , PDI 0,28 a zeta potenciál $+29,0 \pm 1,0$. Po hodině inkubace v DMEM médiu se velikost zmenšila o skoro 14 % na 109 ± 29 nm, PDI bylo podstatně zvýšeno zhruba o 157 % ($0,72 \pm 0,03$) a zeta potenciál významně klesl na hodnotu $-4,9 \pm 0,2$ mV. Po 24 hodinách byla velikost opět zvětšená o necelých 5 % na 133 ± 22 nm, PDI kleslo o necelých 14 % $0,62 \pm 0,11$, zeta potenciál po 24 hodinách autoři nestanovili. Po hodině inkubace v RPMI médiu byla velikost CSNPs 80% snížena na 116 ± 29 nm, PDI bylo zvýšeno na hodnotu $0,47 \pm 0,08$, zeta potenciál významně klesl na $-2,1 \pm 0,4$ mV, podobně jako v DMEM médiu. Po 24 hodinách byla jejich velikost rapidně zvýšená na hodnotu 368 ± 141 nm a PDI mírně vzrostlo na $0,52 \pm 0,03$. Submikročástice CSNPs 93% vykazovaly po přípravě DLS 292 ± 52 nm, PDI $0,18 \pm 0,03$ a zeta potenciál $+20,0 \pm 6,0$ mV. V DMEM médiu byla jejich velikost a zeta potenciál obdobný jako u částic z chitosanu o DD 80 %. Hodnota PDI po 1 hodině představovala $0,49 \pm 0,14$ a po 24 hodinách $0,48 \pm 0,21$. V RPMI médiu oproti DMEM byla jejich velikost po hodině a 24 hodinách zvýšená nad 320 nm a PDI na hodnotu 0,9. Výsledky této diplomové práce a práce Jesus et al. jsou velmi odlišné (viz. tabulka č. 6), ale v obou studiích došlo k interakcím mezi submikročásticemi chitosanu a složkami média, které vytvořily proteinovou korónu, a tím byly jejich fyzikálně-chemické vlastnosti změněny.

Další studie Ozturk et al. (2020) hodnotila stabilitu chitosanových mikročástic v RPMI médiu s 10 % FBS a bez séra při teplotách 4 a 7 °C. V prostředí s FBS, při 37 °C, došlo k výrazné destabilizaci – velikost částic přesáhla 10 μm, PDI vzrostl nad 0,5 a zeta potenciál

klesl téměř na 0 mV. Bez přidaného séra byla destabilizace chitosanových mikročástic mírnější, avšak i zde se zeta potenciál snížil až na -5 mV. Při 4 °C zůstaly parametry mikročástic stabilní i po 48 hodinách. Tato diplomová práce vykazuje obdobné výsledky. Po vložení submikročástic CS/TPP do RPMI média s FBS došlo k rapidnímu zvýšení velikosti, PDI a k velkému snížení zeta potenciálu, viz. tabulka č. 6. Parametry částic této diplomové práce svědčí o silné agregaci a ztrátě elektrostatické stability, stejně jako ve studii Ozturk et al.

Studie Goycoolea et al. (2012) sledovala stabilitu chitosanových mikrokapslí s enkapsulovaným kapsaicinem v závislosti na molekulové hmotnosti a stupni acetylce (DA) v kultivačních médiích MEM a RPMI s FBS. Mikrokapsle byly připraveny z chitosanu o nízké a střední MW a s DA v rozsahu 1,4–56 %. Po 48 hodinách v RPMI médiu došlo k výrazné agregaci částic, zejména u částic se střední molekulovou hmotností a nízkým DA, jejichž velikost přesáhla 1 µm. V MEM médiu zůstaly částice stabilnější, i když s nižším zeta potenciálem. Výsledky submikročástic chitosanu o DD 75–85 % v této diplomové práci potvrzují podobné trendy, kdy v RPMI médiu došlo k výrazné agregaci částic, jejichž velikost přesáhla 1 µm a poklesu zeta potenciálu k nulovým hodnotám. Na druhou stranu v MEM médiu bylo zaznamenáno zmenšení částic pod 30 nm, mírně zvýšený PDI oproti hodnotám v RPMI médiu a nulový zeta potenciál, což naznačuje rozpad částic (viz. tabulka č. 6.). Výsledky studie Goycoolea et al. a této diplomové práce potvrzují, že složení média zásadně ovlivňuje fyzikální stabilitu chitosanových částic.

Chitosanové částice v kultivačním médiu MEM a RPMI vykazovaly značnou nestabilitu. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti po vložení do kultivačního média mohou výrazně ovlivňovat výsledek buněčných experimentů. Interakce mezi částicemi z chitosanu a složkami kultivačního média mohou změnit velikost částic (např. agregací), snížit zeta potenciál nebo vést k tvorbě tzv. proteinové koróny. Pokles zeta potenciálu, v důsledku adsorpce proteinů, může snížit schopnost částic vázat se na buněčný povrch, zatímco agregované částice mohou omezit vstup do buněk. V této diplomové práci, i přes degradaci chitosanových částic v kultivačních médiích, nevykazovaly chitosanové částice vůči buňkám A549 a A2780 cytotoxický účinek a zároveň byly účinně internalizovány do buněk.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala přípravou částic z chitosanu a testováním jejich cytotoxicity *in vitro* vůči nádorovým liniím A549 a A2780. Sledovala se stabilita chitosanových submikročástic v čase v deionizované vodě a po přidání do kultivačních médií. Zároveň byly připraveny chitosanová submikročástice značené fluorescenčním barvivem FITC k vyhodnocení internalizace těchto částic do buněk nemalobuněčného adenokarcinomu plic.

V rámci provedené metody XTT bylo zjištěno, že chitosanové submikročástice nevykazovaly cytotoxický účinek vůči buněčným liniím A549 a A2780, naopak při nejnižších koncentracích vykazovaly zvýšenou viabilitu buněk přes 110 %. Zároveň byly efektivně internalizovány do buněk vykazovaly stabilitu po celou dobu skladování, naopak v kultivačních médiích byly bezprostředně agregovány nebo rozbity na menší frakce, čímž vykazovaly značnou nestabilitu.

Závěrem lze říct, že chitosanové částice, vzhledem k jejím vynikajícím fyzikálně-chemickým vlastnostem, mají velký potenciál jako nosiče léčiv v klinických aplikacích. Je však nutné zajistit stabilitu těchto částic úpravou jejich složení nebo modifikacemi.

SEZNAM LITERATURY

- ABBASI, A., EDJLALI, L., BABAZADEH, M. A., GHASEMI, E. and MAHDAVINIA, G. R. Tripolyphosphate-crosslinked chitosan-based nanoparticles as pH responsive for curcumin release. *Polymer Bulletin*. 2025, **82**, 2251–2268. ISSN 0170-0839. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05617-y>
- ABBASI, R., SHINEH, G., MOBARAKI, M., DOUGHTY, S. and TAYEBI, L. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *Journal of Nanoparticle Research*. 2023, **25**(43). ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>
- ABEDIAN, Z., JENABIAN, N., MOGHADAMNIA, A. A., ZABIHI, E., TASHAKORIAN, H., RAJABNIA, M., SADIGHAN, F., and BIJANI, A. Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. *Journal of Conservative Dentistry*. 2019, **22**(2), 169–174. ISSN 0972-0707. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_300_18
- ALASTAL, A., ABU KWAIK, A. D., MALKAWI, A. A., BALTZLEY, S. and AL-GHANANEEM, A. M. Enhancing intranasal delivery and bioavailability of dihydroergotamine utilizing chitosan nanoparticles. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2023, 2023, 1–8. ISSN 0269-4727. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2023/2284371>
- ALCANTARA, K. P., NALINRATANA, N., CHUTIWITOONCHAI, N., CASTILLO, A. L., BANLUNARA, W., VAJRAGUPTA, O., ROJSITTHISAK, P. and ROJSITTHISAK, P. Enhanced nasal deposition and anti-coronavirus effect of favipiravir-loaded mucoadhesive chitosan–alginate nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2022, **14**(12). ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122680>
- ALFARO-GONZÁLEZ, B., ULATE, D., ALVARADO, R. and ARGÜELLO-MIRANDA, O. Chitosan-silver nanoparticles as an approach to control bacterial proliferation, spores and antibiotic-resistant bacteria. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2018, **4**(3), 035011. ISSN 2057-1976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aaaafe>
- ALGHAMDI, M. A., FALLICA, A. N., VIRZÌ, N., KESHARWANI, P., PITTALÀ, V. and GREISH, K., The promise of nanotechnology in personalized medicine. *Journal of*

Personalized Medicine [online]. 2022, **12**(5), 673. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm12050673>

AMIRNASR, M., FALLAH TAFTI, T., SANKIAN, M., REZAEI, A. and TAFAGHODI, M. Immunization against HTLV-I with chitosan and tri-methylchitosan nanoparticles loaded with recombinant env23 and env13 antigens of envelope protein gp46. *Microbial Pathogenesis*. 2016, **97**, 38–44. ISSN 0882-4010. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.012>

ANSARI, M. and DARVISHI, A. A. review of the current state of natural biomaterials in wound healing applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024, **12**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1309541>

BOZA, A., WŁODARCZYK-BIEGUN, M. K., DEL CAMPO, A., VÁZQUEZ-LASA, B. A SAN ROMÁN, J. Chitosan-based inks: 3D printing and bioprinting strategies to improve shape fidelity, mechanical properties, and biocompatibility of 3D scaffolds. *Biomecánica*, 2019, **27**, s. 7–16. DOI: 10.5821/sibb.27.1.9199.

BOLKOVÁ, Alex. Příprava chitosanových částic s proteiny pro podání na sliznici. Pardubice, 2021. Diplomová práce. Univerzita Pardubice

BRAVO-ANAYA, L. M., FERNÁNDEZ-SOLÍS, K. G., ROSSELGONG, J., NANO-RODRÍGUEZ, J. L. E., CARVAJAL, F. and RINAUDO, M. Chitosan–DNA polyelectrolyte complex: Influence of chitosan characteristics and mechanism of complex formation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **126**, 1037–1049. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.008>

CAI, Y. and LAPITSKY, Y. Biomolecular uptake effects on chitosan/tripolyphosphate micro- and nanoparticle stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020, **193**. ISSN 0927-7765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111081>

CARRASCO-SANDOVAL, J., ARANDA, M., HENRÍQUEZ-AEDO, K., FERNÁNDEZ, M., LÓPEZ-RUBIO, A. and FABRA, M. J. *Impact of molecular weight and deacetylation degree of chitosan on the bioaccessibility of quercetin encapsulated in alginate/chitosan-*

coated zein nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, **242**, 124876. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124876>

CELL SIGNALING TECHNOLOGY. *XTT Cell Viability Kit: Assay protocol*. 7. 2024. Dostupné z: <https://media.cellsignal.com/pdf/9095.pdf>

CORREIA, C., PEIXOTO, D., SOARES DA COSTA, D., REIS, R. L., PASHKULEVA, I. and ALVES, N. M. Development and in vitro assessment of injectable, adhesive, and self-healing chitosan-based hydrogels for treatment of spinal cord injury. *Biomaterials Advances*. 2025, 167, 214090. ISSN 2772-9508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.214090>

COSTA, E. M., SILVA, S. and PINTADO, M. Chitosan Nanoparticles Production: Optimization of Physical Parameters, Biochemical Characterization, and Stability upon Storage. *Applied Sciences*. 2023, **13**(3), 1900. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app13031900>

CUI, L., FENG, X., LIU, W., LIU, H., QIN, Q., WU, S., HE, S., PANG, X., MEN, D. and ZHU, Ch. Cell Type-Dependent Specificity and Anti-Inflammatory Effects of Charge-Reversible MSNs-COS-CMC for Targeted Drug Delivery in Cervical Carcinoma. *Molecular Pharmaceutics*. 2020, **17**(6), 1910–1921. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00004>

DABAGHIAN, M., LATIFI, A. M., TEBIANIAN, M., NAJMINEJAD, H. and EBRAHIMI, S. M. Nasal vaccination with r4M2e.HSP70c antigen encapsulated into N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticulate systems: Preparation and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*. 2018, **36**(20), 2886–2895. ISSN 0264-410X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.072>

DANAEI, M., DEGHANKHOLD, M., ATAEI, S., HASANZADEH DAVARANI, F., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S. and MOZAFARI, M.R. *Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems*. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(2), 57. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

DAS, B., TRIPATHY, S., ADHIKARY, J., CHATTOPADHYAY, S., MANDAL, D., DASH, S. K., DAS, S., DEY, A., DEY, S. K., DAS, D. and ROY, S. Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *Journal of*

Biological Inorganic Chemistry. 2017, **22**(7), 893–918. ISSN 1432-1327. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1468-x>

DE PINHO NEVES, A. L., MILIOLI, C. C., MÜLLER, L., RIELLA, H. G., KUHNEN, N. C. and STULZER, H. K. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, **445**, 34–39. ISSN 0927-7757. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>

DES BOUILLONS-GAMBOA, L., MAZA, A., ARÉVALO-VILLENA, A. and MOLINA, G. A. Chitosan nanoparticles: Shedding light on immunotoxicity and hemocompatibility. *Frontiers in Chemistry*. 2024, **12**. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1469271>

DONG, L., LI, Y., CONG, H., YU, B. and SHEN, Y. A review of chitosan in gene therapy: Developments and challenges. *Carbohydrate Polymers*. 2024, 324, 121562. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121562>

DOU, T., WANG, J., HAN, C., SHAO, X., ZHANG, J. and LU, W. Cellular uptake and transport characteristics of chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **138**, 791–799. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.168>

DUMKLIANG, E., PAMORNPATHOMKUL, B., PATROJANASOPHON, P., NGAWHIRUNPAT, T., ROJANARATA, T., YOKSAN, S. and OPANASOPIT, P. Feasibility of chitosan-based nanoparticles approach for intranasal immunisation of live attenuated Japanese encephalitis vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 183, 1096–1105. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.050>

DYAWANAPELLY, S., KOLI, U., DHARAMDASANI, V., JAIN, R. and DANDEKAR, P. *Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide*

surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. Drug Delivery and Translational Research. 2016, **6**(4), 365–379. DOI: 10.1007/s13346-016-0295-x

EKINCI, S. and GÜZEL, F. The investigation of kinetic and thermodynamic properties of the adsorption of Trypan Blue dyestuff by chitosan and chitosan phthalate. *International Journal of Scientific and Technological Research*. 2019, **5**(1), 115–125. ISSN 2422-8702.

ENGLERT, Ch., BRENDEL J. C., MAJDANSKI T. C. and YILDIRIM T. Pharmapolymers in the 21st century: Synthetic polymers in drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*. 2018, **87**. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.005>

FAR, F. B., NAIMI-JAMAL, M.R., JAHANBAKHSI, M., HADIZADEH, A., DEHGHAN, S. and HADIZADEH, S. Enhanced antibacterial activity of porous chitosan-based hydrogels crosslinked with gelatin and metal ions. *Scientific Reports*. 2024, **14**, 7505. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58174-9>

FATIMI, A. Chitosan-based hydrogels: Patent analysis. *Materials Proceedings*. 2022, **9**, 1. ISSN 2673-4605. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/materproc2022009001>

GOU, Y., WENG, Y., CHEN, Q., WU, J., WANG, H., ZHONG, J., BI, Y., CAO, D., ZHAO, P., DONG, X., GUO, M., WAGSTAFF, W., HENDREN-SANTIAGO, B., CHEN, C., YOUSSEF, A., HAYDON, R. C., LUU, H. H., REID, R. R., SHEN, L., HE, T.-Ch. and FAN, J. Carboxymethyl chitosan prolongs adenovirus-mediated expression of IL-10 and ameliorates hepatic fibrosis in a mouse model. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2022, **7**(3), e10306. ISSN 2380-6761. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btm2.10306>

GROZA, A., HURJUI, M. E., YEHIA-ALEXE, S. A., STAIKU, C., BLEOTU, C., ICONARU, S. L., CIOBANU, C. S., GHEGOIU, L. and PREDOI, D. Influence of Electron Beam Irradiation and RPMI Immersion on the Development of Magnesium-Doped Hydroxyapatite/Chitosan Composite Bioactive Layers for Biomedical Applications. *Polymers*. 2025, **17**(4). ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym17040533>

GUARNIERI, A., TRIUNFO, M., SCIEUZO, C., IANNICIELLO, D., TAFI, E., HAHN, T., ZIBEK, S., SALVIA, R. and FALABELLA, P. *Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect Hermetia illucens*. *Scientific*

Reports, 2022, **12**, 8084. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12150-3>

HABAS, K., BRINKWORTH, M. H. and ANDERSON, D. *Silver nanoparticle-mediated cellular responses in isolated primary Sertoli cells in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, **116**, 182–188. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.030>

HASSAN, D. M., EL-KAMEL, A. H., ALLAM, E. A., BAKR, B. A. and ASHOUR, A. A. Chitosan-coated nanostructured lipid carriers for effective brain delivery of Tanshinone IIA in Parkinson's disease: interplay between nuclear factor-kappa β and cathepsin B. *Drug Delivery and Translational Research*. 2024, 14, 400–417. ISSN 2190-393X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01407-7>

HASSAN, R. H., GAD, H. A., EL-DIN, S. B., SHAKER, D. S. and ISHAK, R. A. H. Chitosan nanoparticles for intranasal delivery of olmesartan medoxomil: Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022, 628, 1–13. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122278>

HORIBA Scientific. *Z-Average Size Determined by DLS*. Irvine [online]: HORIBA Instruments Incorporated, 2021. [cit. 2025-04-04]. Technical Note TN171. Dostupné z: <https://www.horiba.com/int/scientific/products/particle-characterization/technology/detail/news/detail/Z-Average-Size-Determined-by-DLS-TN171/>

HORIBA Scientific. *Understanding and Interpreting PSD Calculations*. Irvine [online]: HORIBA Instruments Incorporated, 2021. [cit. 2025-04-04]. Technical Note TN156. Dostupné z:

https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Particle_Characterization/Downloads/Technical_Notes/TN156_Understanding_and_Interpreting_PSD_Calculations.pdf

HEMALATHA, T., PRABU, P., GUNADHARINI, D. N. and GOWTHAMAN, M. K. Fabrication and characterization of dual acting oleyl chitosan functionalised iron oxide/gold hybrid nanoparticles for MRI and CT imaging. *International Journal of*

Biological Macromolecules. 2018, 112, 250–257. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.159>

HSUEH, Y.-J., MA, D. H.-K., MA, K. S.-C., WANG, T.-K., CHOU, Ch.-H., LIN, Ch.-Ch., HUANG, M.-C., LUO, L.-J., LAI, J.-Y. and CHEN, H.-Ch. Extracellular matrix protein coating of processed fish scales improves human corneal endothelial cell adhesion and proliferation. *Translational Vision Science & Technology*. 2019, **8**(3), 27. ISSN 2164-2591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1167/tvst.8.3.27>

HUANG, M., MA, Z., KHOR, E. and LIM, L.-Y. Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells. *Pharmaceutical Research*. 2002, **19**(10), 1488–1494. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1020456903606>

HUO, S., JIN, S., MA, X., XUE, X., YANG, K., KUMAR, A., WANG, P. C., ZHANG, J., HU, Z. and LIANG, X. *Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry*. *ACS Nano*, 2014, **8**(6), 5852–5862. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/nn5008572>

CHAE, K., SHIN, Ch. and SHIN, W. Characteristics of cricket (*Gryllus bimaculatus*) chitosan and chitosan-based nanoparticles. *Food Science and Biotechnology*. 2018, **27**, 631–639. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1007/s10068-018-0314-4](https://doi.org/10.1007/s10068-018-0314-4)

CHAIWONG, N., LEELAPORNPID, P., JANTANASAKULWONG, K., RACHTANAPUN, P., SEESURIYACHAN, P., SAKDATORN, V., LEKSAWASDI, N. and PHIMOLSIRIPOL, Y. *Antioxidant and moisturizing properties of carboxymethyl chitosan with different molecular weights*. *Polymers*, 2020, **12**(7), 1445. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym12071445>

CHAUHAN, M., SONALI, SHEKHAR, S., YADAV, B., GARG, V., DUTT, R., MEHATA, A. K., GOSWAMI, P., KOCH, B., MUTHU, M. S. and SINGH, R. P. AS1411 aptamer/RGD dual functionalized theranostic chitosan-PLGA nanoparticles for brain cancer treatment and imaging. *Biomaterials Advances*. 2024, 160, 213833. ISSN 2772-9508. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.213833>

CHEN, X., YUE, J., XU, X., CHEN, J., HUANG, X., HUANG, Y., YANG, Y., LI, F. and LI, T. Surface different charge ligands for modulating selenium nanoparticles formation and activating the interaction with proteins for effective anti-Herpes simplex virus 1

infection. *Nanotechnology*. 2025, **36**(6). ISSN 1361-6528. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ad902b>

CHEN, Y., LI, G., GE, Y., LIU, S., WENG, J., LIN, J., XIONG, A., ZENG, H., WU, X., YANG, J. and YU, F. Repair of cartilage defects using ATDC5 cells treated with BBR loaded in chitosan hydrogel. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2025, **11**, 493–505. ISSN 2373-9878. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c01645>

CHRONOPOULOU, L., FALASCA, F., DI FONZO, F., TURRIZIANI, O. and PALOCCI, C. siRNA transfection mediated by chitosan microparticles for the treatment of HIV-1 infection of human cell lines. *Materials*. 2022, **15**(15), 5340. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma15155340>

CHU, Z., ZHANG, S., ZHANG, B., ZHANG, C., FANG, C.-Y., REHOR, I., CIGLER, P., CHANG, H.-C., LIN, G., LIU, R. and LI, Q. Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles. *Scientific Reports*. 2014, **4**. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep04495>

ISWANTI, F. C., NURULITA, I., DJAUZI, S., SADIKIN, M., WITARTO, A. B. and YAMAZAKI, T. Preparation, characterization, and evaluation of chitosan-based nanoparticles as CpG ODN carriers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019, **33**(1), 390–396. ISSN 1310-2818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1578690>

JAFERNIK, K., ŁADNIAK, A., Blicharska, E., CZARNEK, K., EKIERT, H., WIĄCEK, A. E. and SZOPA, A. Chitosan-based nanoparticles as effective drug delivery systems – A review. *Molecules*. 2023, **28**(4), 1963. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28041963>

JAKAEW, P., JEANANAIWITAYAKUL, T., MIDOENG, P., MASRINOUL, P., SUNINTABOON, P. and UBOL, S. Responses of primary human nasal epithelial cells to COVID-19 vaccine candidate. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2024. DOI: 10.12932/AP-230523-1623

JAMARAN, S., JAFARI, P., MARJANI, A., AKBARI, N. and FEIZABAD, M. M. Novel wound dressing based on postbiotic/chitosan film accelerates cutaneous wound healing.

Jundishapur Journal of Microbiology. 2022, **14**(12), e120806. ISSN 2008-3645. Dostupné z: <https://doi.org/10.5812/jjm.120806>

JESUS, S., MARQUES, A. P., DUARTE, A., SOARES, E., COSTA, J. P., COLAÇO, M., SCHMUTZ, M., SOM, C., BORCHARD, G., WICK, P. and BORGES, O. Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, **8**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00100>

JHAVERI, J., RAICHURA, Z., KHAN, T., MOMIN, M. and OMRI, A. Chitosan nanoparticles-Insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*. 2021, **26**(2), 272. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26020272>

JIANG, L. Q., WANG, T. Y., WEBSTER, T. J., DUAN, H.-J., QIU, J. Y., ZHAO, Z. M., YIN, X. X. and ZHENG, Ch. L. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, **12**, 6383–6398. ISSN 1176-9114. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S142060>

JIAO, F., SANG, J., LIU, Z., LIU, W. and LIANG, W. Effect of concentration of PEG coated gold nanoparticle on lung surfactant studied with coarse-grained molecular dynamics simulations. *Biophysical Chemistry*. 2020, **266**. ISSN 0301-4622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106457>

KAHLOUS, Y., PALANIRAJAN, V. K., STARLIN, T., NEGI, J. S. and CHEAH, S. C. Preparation and characterization of chitosan and inclusive compound-layered gold nanocarrier to improve the antiproliferation effect of tamoxifen citrate in colorectal adenocarcinoma (Caco-2) and breast cancer (MCF-7) cells. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022, **19**(4), 391–399. ISSN 2148-6247. Dostupné z: <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.48961>

KARATOP, E. U., CIMENCI, C. E. and AKSU, A. M. Colorimetric Cytotoxicity Assays. *IntechOpen*. 2022, 1-11. ISSN 978-1-80356-247-6. Dostupné z: [doi:10.5772/intechopen.105772](https://doi.org/10.5772/intechopen.105772)

KHADEMI, Z., RAMEZANI, M., ALIBOLANDI, M., ZIRAK, M. R., SALMASI, Z., ABNOUS, K. and TAGHDISI, S. M. A novel dual-targeting delivery system for specific delivery of CRISPR/Cas9 using hyaluronic acid, chitosan and AS1411. *Carbohydrate*

- Polymers*. 2022, 292, 119691. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119691>
- KHALEF, L., LYDIA, R., FILICIA, K. and M., B. Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochemistry and Function*. 2024, **42**(3), e4007. ISSN 1099-0844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cbf.4007>
- KHAN, I., SAEED, K. and KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, **12**(7), 908–931. ISSN 1878-5352. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- KUMAR, Y., SINHA, A. S. K., NIGAM, K. D. P., DWIVEDI, D. and SANGWAI, J. S. Functionalized nanoparticles: Tailoring properties through surface energetics and coordination chemistry for advanced biomedical applications. *Nanoscale*. 2023, **15**(14), 6075–6104. ISSN 2040-3372. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d2nr07163k>
- KUMARASAMY, M., TRAN, N., PATARROYO, J., MISHRA, S., MONOPOLI, M., MADARASZ, E. and PUNTES V. The effects of silver nanoparticle shape on protein adsorption and neural stem cell viability. *ChemistrySelect*. 2022, **7**(39). ISSN 2365-6549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/slct.202201917>
- LEWANDOWSKA, K. Characterization of chitosan composites with synthetic polymers and inorganic additives. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, **81**, 159-164. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.003)
- LI, Ch., FANG, K., HE, W., LI, K., JIANG, Y. and LI, J. Evaluation of chitosan-ferulic acid microcapsules for sustained drug delivery: Synthesis, characterizations, and release kinetics in vitro. *Journal of Molecular Structure*. 2021, 1227, 129353. ISSN 0022-2860. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129353>
- LI, J., QIAO, X., WEI, Z., YANG, Q., XU, S., LI, Ch. and LUO, X. An antifouling electrochemical biosensor based on chitosan and DNA dual-network hydrogel for ATP quantification in complex biofluids. *Sensors and Actuators: B. Chemical*. 2025, **424**, 136937. ISSN 0925-4005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2024.136937>
- LIN, J., JARAND, C. W., BRADER M. L. and REED W. F. Angle-dependent effects in DLS measurements of polydisperse particles. *Measurement Science and Technology*. 2022, **33**, 1-15. Dostupné z: [doi:10.1088/1361-6501/ac42b2](https://doi.org/10.1088/1361-6501/ac42b2)
- LIU, S., YANG, S. and HO, P. C. Intranasal administration of carbamazepine-loaded carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain. *Asian Journal of*

Pharmaceutical Sciences. 2018, **13**(1), 72–81. ISSN 1818-0876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.09.001>

LUO, J., MIAO, Z., HUANG, X., YANG, Y., LIU, M., SHEN, G. and YANG, T. Translational albumin nanocarrier caging photosensitizer for efficient cancer photodynamic therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023, 11, 1132591. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1132591>

LUTTER, A.-H., SCHOLKA, J., RICHTER, H. and ANDERER, U. Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: A comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures. *SAGE Publications*. 2017, **67**(3-4), 327-342. ISSN 1875-8622. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3233/CH-179213](https://doi.org/10.3233/CH-179213)

MAIZ-FERNÁNDEZ, S., BARROSO, N., PÉREZ-ÁLVAREZ, L., SILVÁN, U., VILAS-VILELA, J. L. and LANCEROS-MÉNDEZ, S. 3D printable self-healing hyaluronic acid/chitosan polycomplex hydrogels with drug release capability. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, **188**, 820–832. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.022>

MATHABA, M. and DARAMOLA, M.O. Effect of Chitosan's Degree of Deacetylation on the Performance of PES Membrane Infused with Chitosan during AMD Treatment. *Membranes*. 2020, **10**(3), 1-16. Dostupné z: [doi:doi:10.3390/membranes10030052](https://doi.org/10.3390/membranes10030052)

MEDHA and SETHI S. Chitosan based hybrid superabsorbent for controlled drug delivery application. *Biotechnology Progress*. 2024, **40**(2), 1-18. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.862495](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.862495)

MEESARAGANDLA, B., KOMARAGIRI, Y., SCHLÜTER, R., OTTO, O. and DELCEA, M. The impact of cell culture media on the interaction of biopolymer-functionalized gold nanoparticles with cells: mechanical and toxicological properties. *Scientific Reports*. 2022, **12**. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20691-w>

MILENKOVA, S., AMBRUS, R., MUKHTAR, M., PILICHEVA, B. and MARUDOVA, M. Spray-dried chitosan hydrogel particles as a potential delivery system for benzydamine hydrochloride. *Gels*. 2024, **10**(3), 189. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels10030189>

MINH, N. C., HOANG, N. C., PHAM, T. D. P., SCHWARZ, S., STEVENS, W. F., NGUYEN, V. H. and TRANG, S. T. Swelling-assisted reduction of chitosan molecular

weight in the solid state using hydrogen peroxide. *Polymer Bulletin*. 2017, **74**(8), 3077–3087. ISSN 1436-2449. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1880-3>

MULTARI, C., MIOLA, M., FERRARIS, S., MOVIA, D., ŽUŽEK ROŽMAN, K., KOSTEVŠEK, N., FOLLENZI, A., VERNÉ, E. and PRINA-MELLO A. Synthesis and characterization of silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and interaction with pancreatic cancer cells. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2018, **15**(4), 947–960. ISSN 1546-542X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijac.12897>

NAJMINEJAD, H., KALANTAR, S. M., REZAEI MOKARRAM, A., DABAGHIAN, M., ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, M., EBRAHIMI, S. M., TEBIANIAN, M., FASIHI RAMANDI, M. and SHEIKHHA, M. H. *Bordetella pertussis* antigens encapsulated into N-trimethyl chitosan nanoparticulate systems as a novel intranasal pertussis vaccine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019, **47**(1), 2605–2611. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1629948>

NEVAGI, R. J., KHALIL, Z. G., HUSSEIN, W. M., POWELL, J., BATZLOFF, M. R., CAPON, R. J., GOOD, M. F., SKWARCZYNSKI, M. and TOTH, I. Polyglutamic acid–trimethyl chitosan-based intranasal peptide nano-vaccine induces potent immune responses against group A streptococcus. *Acta Biomaterialia*. 2018, **80**, 278–287. ISSN 1742-7061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.037>

NGA, N.T.H., NGOC T.T.B. and TRINH N.T.M. Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102W device, an alternative practical approach for cell counting. *Analytical Biochemistry*. 2020, **610**, 1-11. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937](https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113937)

NUNES, Á. M., DA SILVA FILHO, R. C., DA SILVA, K. R. M., BEZERRA, S. M., DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q., SARAIVA, K. L. A., LEITE, A. C. R. and MENEGHETTI M. R. Gold nanoparticles with different shapes can cause distinct effect on mitochondria bioenergetics. *Journal of Nanoparticle Research*. 2022, **24**. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05410-w>

NURJIS, F., SARWAR, U., ALI, J.S. and FAYYAZ, M. Doxorubicin and Curcumin-Loaded Nanomicelles Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *BioNanoScience*. 2024,

14, 2159–2169. ISSN 2191-1649. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01529-3>

OSANLOO, M., NOORI, F., TAVASSOLI, A., ATAOLLAHI, M. R., DAVOODI, A., SEIFALAH-ZADE, M., TAGHINEZHAD, A., FEREDOUNI, N. and GOODARZI, A. Effect of PCL nanofiber mats coated with chitosan microcapsules containing cinnamon essential oil for wound healing. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2023, **23**. ISSN 2662-7671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03905-0>

OUDIH, B. S., TAHTAT, D., NACER KHODJA, A., MAHLOUS, M., HAMMACHE, Y., GUITTOUM, A.-E. and KEBBOUCHE GANA, S. Chitosan nanoparticles with controlled size and zeta potential. *Polymer Engineering & Science*. 2023, **63**(3), 1011–1021. ISSN 1548-2634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pen.26261>

OZTURK, K., ARSLAN, F. B., TAVUKCUOGLU, E., ESENDAGLI, G. and CALIS, S. Aggregation of chitosan nanoparticles in cell culture: Reasons and resolutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, **578**. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119119>

OZTURK, R., DURASI, E., ÇALIK, H., ARI YUKA, S. and ÇAKIR, R. Nitidine and paclitaxel co-loaded lipid-chitosan hybrid nanoparticles overcome ABCB1-mediated multidrug resistance in ovarian cancer. *ChemMedChem*. 2025. DOI: 10.1002/cmdc.202500065

PANWAR, R., PEMMARAJU, S. C., SHARMA, A. K. and PRUTHI, V. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. *Microbial Pathogenesis*. 2016, **95**, 21–31. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.02.007

PAREDES GUERRERO, D. J., ARTUNDUAGA BONILLA, J. J., ORTIZ LÓPEZ, C. C. and SÁEZ TORRES R. G. Encapsulation of Silver Nanoparticles in Polylactic Acid or Poly(lactic-co-glycolic acid) and Their Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2019, (19), 1-9. Dostupné z: [doi:doi:10.1166/jnn.2019.16663](https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16663)

PAREDES-HERNÁNDEZ, U., AGUILAR-PEÑA, L. V., ISAAC-OLIVÉE, K., OCAMPO-GARCÍA, B., CONTRERAS, I., ESTRADA, J. A., IZQUIERDO, G., MORALES-AVILA, E. and ARANDA-LARA, L. Enhancing photodynamic and radionuclide therapy by small interfering RNA (siRNA)-RAD51 transfection via self-

emulsifying delivery systems (SNEDDS). *Cytotherapy*. 2025, 27, 66–77. ISSN 1465-3249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.08.003>

PATHAK, Ch., VAIDYA, F. U., WAGHELA, B. N., JAISWARA, P. K., GUPTA, V. I. K., KUMAR, A., RAJENDRAN, B. K. and RANJAN, K. Insights of Endocytosis Signaling in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24(3). ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24032971>

PENG, S., NIU, S., GAO, Q., SONG, R., WANG, Z., LUO, Z., ZHANG, X. and QIN, X. Hydroxypropyl chitosan/ ϵ -poly-L-lysine based injectable and self-healing hydrogels with antimicrobial and hemostatic activity for wound repair. *Carbohydrate Polymers*. 2024, 337, 122135. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122135>

PERDE-SCHREPLER, M., FLOREA, A., BRIE, I., VIRAG P., FISCHER-FODOR, E., VÂLCAN, A., GURZĂU, E., LISENCU, C. and MANIU, A. Size-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in cochlear cells in vitro. *Journal of Nanomaterials*. 2019. ISSN 1687-4110. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/6090259>

PEREIRA, P., PEDROSA, S. S., WYMANT, J. M., SAYERS, E., CORREIA, A., VILANOVA, M., JONES, A. T. and GAMA, F. M. siRNA Inhibition of Endocytic Pathways to Characterize the Cellular Uptake Mechanisms of Folate-Functionalized Glycol Chitosan Nanogels. *Molecular Pharmaceutics*. 2015, 12(6), 1970–1979. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/mp500785t>

PRATAP SINGH, R., SHARMA GUNJAN, SONALI, SANJA SINGH, SHREEKANT BHARTI, BAJARANGRAPASAD L. PANDEY, BIPLOB KOCH, MADASWAMY S. MUTHU. Chitosan-folate decorated carbon nanotubes for site specific lung cancer delivery. *Materials Science and Engineering C*. 2017, 77, 446-458. Dostupné z: [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.225](http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.225)

QIU, B., CHENG, Q., CHEN, R., LIU, Ch., QIN, J. and JIANG, Q. Mussel-mimetic hydrogel coating with anticoagulant and antiinflammatory properties on a poly(lactic acid) vascular stent. *Biomacromolecules*. 2024, 25(5), 3098–3111. ISSN 1526-4602. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.4c00201>

RADWAN-PRAGŁOWSKA, J., JANUS, Ł., PIĄTKOWSKI, M., BOGDAŁ, D. and MATÝSEK, D. Hybrid bilayer PLA/chitosan nanofibrous scaffolds doped with ZnO,

Fe₃O₄, and Au nanoparticles with bioactive properties for skin tissue engineering. *Polymers*. 2020, **12**(1), 159. DOI: 10.3390/polym12010159

RAKSHIT, S., PAL, K., MONDAL, S., JANA, A., MONDAL, K. C. and HALDER, S. K. Extraction of chitosan from biologically-derived chitin by bacterial chitin deacetylase: process optimization and product quality assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, **244**. ISSN 0141-8130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125389>

RAMPINO, A., MASSIMILIANO, B., BLASI, P., BELLICHA, B. and CESÀRO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, **455**(1-2), 219–228. ISSN 0378-5173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>

RÁZGA, F., VNUKOVÁ, D., NÉMETHOVÁ, V., MAZANCOVÁ, P. and LACÍK, I. Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **151**, 488–499. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.092>

REJINOLD, N. G., THAKUR, R. S., BHATNAGAR, I., CHO, Ch. and JAYAKUMAR, R. Chitosan hybrids for cosmeceutical applications in skin, hair and dental care: an update. *Carbohydrate Polymers*. 2021, **273**, 118524. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118524>

REN, H., ZHANG, Z., LU, K. L., SHEN, Y. Y., HE, Ch. L. and CHEN, X. S. Injectable chitosan hydrogels loaded with antioxidant agent as first-aid dressings for second-degree burn wounds. *Science China Technological Sciences*. 2024, **67**(3), 891–901. ISSN 1674-7321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11431-023-2509-4>

RISS, T.L., MORAVEC R.A., NILES L.S., DUELLMAN S., BENINK H., WORZELLA T.J. and M. L. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual*[online]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), 2018, s. 357-388. [cit. 2024-09-03]. Dostupné z: <https://bpb-us-w2.wpmucdn.com/u.osu.edu/dist/2/113446/files/2022/01/Assay-Guidance-Manual-2018.pdf>

ROSHANBINFAR, K., KOLESNIK-GRAY, M., ANGELONI, M., SCHRUEFER, S., FIEDLER, M., SCHUBERT, D. W., FERRAZZI, F., KRSTIC, V. and ENGEL, F. B. Collagen hydrogel containing polyethylenimine-gold nanoparticles for drug release and

enhanced beating properties of engineered cardiac tissues. *Advanced Healthcare Materials*. 2023, **12**(20). ISSN 2192-2659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.202202408>

SATHIYASEELAN, A., SARAVANAKUMAR, K., MANIVASAGAN, P., JEONG, M. S., JANG, E.-S. and WANG, M.-H. Folic acid conjugated chitosan encapsulated palladium nanoclusters for NIR triggered photothermal breast cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*. 2022, **280**, 119021. ISSN 0144-8617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119021>

SAVA, V., FIHURKA, O., KHVOROVA, A. and SANCHEZ-RAMOS, J. Enriched chitosan nanoparticles loaded with siRNA are effective in lowering Huntington's disease gene expression following intranasal administration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020, **24**, 102119. ISSN 1549-9634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102119>

SAVA, V., FIHURKA, O., KHVOROVA, A. and SANCHEZ-RAMOS, J. Kinetics of HTT lowering in brain of YAC 128 mice following single and repetitive intranasal dosing of siRNA packaged in chitosan-based nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021, **63**, 102517. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102517>

SEYAM, S., CHOUKAIFE H., AL RAHAL O. and ALFATA M. Colonic targeting insulin-loaded trimethyl chitosan nanoparticles coated pectin for oral delivery: In vitro and In vivo studies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, **281**. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136549](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136549)

SHEN, Y., XU, Y., YI, B., WANG, X., TANG, H., CHEN, CH. and ZHANG, Y. Engineering a highly biomimetic chitosan-based cartilage scaffold by using short fibers and a cartilage-decellularized matrix. *Biomacromolecules*. 2021, **22**(5), 2284–2297. ISSN 1526-4602. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00366>

SHIM, S., SOH, S. H., IM, Y. B., AHN, CH., PARK, H.-T., PARK, H.-E., PARK, W. B., KIM, S. and YOO, H. S. Induction of systemic immunity through nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of mice intranasally immunized with *Brucella abortus* malate dehydrogenase-loaded chitosan nanoparticles. *PLOS ONE*. 2020, **15**(2), e0228463. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228463>

SHIRAZI, H., DANESHPOUR, M., KASHANIAN, S. and OMIDFAR, K. Synthesis, characterization and in vitro biocompatibility study of Au/TMC/Fe₃O₄ nanocomposites as

- a promising, nontoxic system for biomedical applications. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2015, **6**, 1677–1689. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3762/bjnano.6.170>
- SIKORSKI, D., GZYRA-JAGIEŁA, K. and DRACZYŃSKI, Z. The Kinetics of Chitosan Degradation in Organic Acid Solutions. *Marine drugs*. 2021, **19**(5), 1-16. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/md19050236>
- SILVESTRO, I., FRANCOLINI, I., DI LISIO, V., MARTINELLI, A., PIETRELLI, L., SCOTTO D'ABUSCO, A., SCOPPIO, A. and PIOZZI, A. Preparation and characterization of TPP-chitosan crosslinked scaffolds for tissue engineering. *Materials*. 2020, **13**(16), 3577. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma13163577>
- STROJAN, K., LEONARDI, A., BREGAR, V. B., KRIŽAJ, I., SVETE, J. and PAVLIN, M. Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PLOS ONE*. 2017, **12**(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552>
- SUKHRAMANI, P. S., SUKHRAMANI, P. S., TIRTHANI, S. R., DESAI, S. A. and SUTHAR, M. P. Biological cytotoxicity evaluation of spiro[azetidine-2, 3'-indole] -2', 4(1'H)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre*. 2011, **3**(5), 236–243. ISSN 0975-5071. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/279778205>
- SUMITHA, N.S., KRISHNA, N. G. and SAILAJA, G.S. Chitosan-TEMPO-Oxidized Nanocellulose Magnetic Responsive Patches with Hyperthermia Potential for Smart Melanoma Therapy. *ACS Applied Polymer Materials*. 2023, **5**(11), 9170–9179. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/acsapm.3c01654>
- ŠEBEK, Jaroslav. *Buněčné kultury v medicíně*. Praha: Galén, 2018. ISBN 978-80-7492-380-7.
- TAMMAM, S. N., AZZAZY, H. ME., BREITINGER, H. G. and LAMPRECHT, A. Chitosan nanoparticles for nuclear targeting: the effect of nanoparticle size and nuclear localization sequence density. *Molecular Pharmaceutics*. 2015, **12**(12), 4277–4289. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00478>
- TAO, F., CHENG, Y., TAO, H., JIN, L., WAN, Z., DAI, F., XIANG, W. and DENG, H. Carboxymethyl chitosan/sodium alginate-based micron-fibers fabricated by emulsion

electrospinning for periosteal tissue engineering. *Materials and Design*. 2020, 194, 108849. ISSN 0264-1275. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108849>

TYLISZCZAK, B., DRABCZYK, A., KUDŁACIK-KRAMARCZYK, S., BIALIK-WĄS, K. and SOBCZAK-KUPIEC, A. In vitro cytotoxicity of hydrogels based on chitosan and modified with gold nanoparticles. *Journal of Polymer Research*. 2017, **24**, 153. ISSN 1572-8935. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1315-3>

VALADI, M., DOOSTAN, M., KHOSHNEVISAN, K., DOOSTAN, M. and MALEKI, H. Enhanced healing of burn wounds by multifunctional alginate–chitosan hydrogel enclosing silymarin and zinc oxide nanoparticles. *Burns*. 2024, 50, 2029–2044. ISSN 0305-4179. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2024.07.021>

VAN BAVEL, N., ISSLER, T., PANG, L., ANIKOVSKIY, M. and PRENNER, E. J. A simple method for synthesis of chitosan nanoparticles with ionic gelation and homogenization. *Molecules*. 2023, **28**(11). ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28114328>

VASHIST, A., ATLURI, V., RAYMOND, A., KAUSHIK, A., PARIRA, T., HUANG, Z., DURYGIN, A., TOMITAKA, A., NIKKHAH-MOSHAIE, R., VASHIST, A., AGUDELO, M., CHAND, H. S., SAYTASHEV, I., RAMELLA-ROMAN, J. C. and NAIR, M. Development of multifunctional biopolymeric auto-fluorescent micro- and nanogels as a platform for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8, 315. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00315>

VICTOIR, B., CROIX, C., GOUILLEUX, F. and PRIÉ, G. Targeted therapeutic strategies for the treatment of cancer. *Cancers*. 2024, **16**(2), 461. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers16020461>

WANG, H., LIU, Y., CAI, K., ZHANG, B., TANG, S., ZHANG, W. and LIU, W. Antibacterial polysaccharide-based hydrogel dressing containing plant essential oil for burn wound healing. *Burns & Trauma*. 2021, 9, 1–14. ISSN 2321-3868. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab041>

WASILEWSKA, A., KLEKOTKA, U., ZAMBRZYCKA, M., ZAMBROWSKI, G., ŚWIĘCICKA, I. and KALSKA-SZOSTKO, B. Physico-chemical properties and antimicrobial activity of silver nanoparticles fabricated by green synthesis. *Food*

Chemistry. 2023, **400**. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133960>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer* [online]. Geneva: WHO, [cit. 2025-04-16]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1

WU, Z., LI, W., CHENG, Sh., LIU, J. and WANG, S. Novel fabrication of bioengineered injectable chitosan hydrogel loaded with conductive nanoparticles to improve therapeutic potential of mesenchymal stem cells in functional recovery after ischemic myocardial infarction. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2023, **47**, 102616. ISSN 1549-9634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102616>

XU, J., LIU, K., CHANG, W., CHIOU, B.-S., CHEN, M. and LIU, F. Regulating the physicochemical properties of chitosan films through concentration and neutralization. *Foods*. 2022, **11**(11), 1657. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11111657>

XUE, Y., WANG, N., ZENG, Z., HUANG, J., XIANG, Z. and GUAN, Y.-Q. Neuroprotective effect of chitosan nanoparticle gene delivery system grafted with acteoside (ACT) in Parkinson's disease models. *Journal of Materials Science & Technology*. 2020, **43**, 197–207. ISSN 1005-0302. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2019.10.013>

YE, B., ZHENG, R., RUAN, X., ZHENG, Z. and CAI, H.-J. Chitosan-coated doxorubicin nano-particles drug delivery system inhibits cell growth of liver cancer via p53/PRC1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018, **495**(1), 414–420. ISSN 0006-291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.156>

YOO, W., LEE, W., KIM, H. N., JEONG, J., PARK, H. H., AHN, J. H., JUNG, D., LEE, J., KIM, J.-S., LEE, S. W., CHO, W.-S. and KIM, S. Nanodiamond as a cytokine sponge in infectious diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, **10**. ISSN 2296-4185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.862495>

YU, N., LI, Y., WANG, Y., XU, H., YE, F. and FU, Q. Healing effect of carboxymethyl chitosan–plantamajoside hydrogel on burn wound skin. *Burns*. 2022, **48**(4), 902–914. ISSN 0305-4179. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.01.019>

YU, Y., HUO, M., FU, Y., XU, W., CAI, H., YAO, L., CHEN, Q., MU, Y., ZHOU, J. and YIN, T. N-Deoxycholic acid-N, O-hydroxyethyl Chitosan with a Sulfhydryl Modification To Enhance the Oral Absorptive Efficiency of Paclitaxel. *Molecular Pharmaceutics*. 2017,

14(12), 4539–4550. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00662>

YU, Q., XIONG, X., ZHAO, L., XU, T., BI, H., FU, R. and WANG, Q. Biodistribution and toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in vitro and in vivo. *Current Medical Science*. 2018, **38**(6), 1096–1102. ISSN 2523-899X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1989-8>

ZENG, A., WANG, Y., LI, D., GUO, J. and CHEN, Q. Preparation and antibacterial properties of polycaprolactone/quaternized chitosan blends. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2021, **32**, 462–471. ISSN 1004-9541. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.001>

ZENG, A., WANG, Y., LI, D., GUO, J. and CHEN, Q. Preparation and antibacterial properties of polycaprolactone/quaternized chitosan blends. *Progress in Polymer Science*. 2021, **32**, 462-471. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.001](https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.001)

ZENG, C., FENG, Y., WANG, W., ZHOU, F., LIAO, F. and LIU, Y. The size-dependent apoptotic effect of titanium dioxide nanoparticles on endothelial cells by the intracellular pathway. *Environmental Toxicology*. 2018, **33**(12), 1217-1329. ISSN 1520-4081. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1002/tox.22628](https://doi.org/10.1002/tox.22628)

ZHANG, J., ZHAO, S., ZHOU, Y., LIANG, H., ZHAO, L. and TAN, H. Carboxymethyl chitosan-based antioxidant hydrogel accelerates diabetic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*. 2025, **14**(4), 2403198. ISSN 2192-2659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.202403198>

ZHANG, S., JI, Y. and HE, Y. Effect of Environmental pH on the Mechanics of Chitin and Chitosan: A Single-Molecule Study. *Polymers*. 2024, **16**(7), 1-10 Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.3390/polym16070995](https://doi.org/10.3390/polym16070995)

ZHANG, Y.-Q., SHEN, Y., LIAO, M.-M., MAO, X., MI, G.-J., YOU, CH., GUO, Q.-Y., LI, W.-J., WANG, X.-Y., LIN, N. and WEBSTER, TJ. Galactosylated chitosan triptolide nanoparticles for overcoming hepatocellular carcinoma: Enhanced therapeutic efficacy, low toxicity, and validated network regulatory mechanisms. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019, **15**(1), 86–97 ISSN 1549-9634. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.09.002>

ZHANG, Y., WANG, G., LI, Q., JIANG, Y., CHEN, W., ZHAO, M., LIANG, G. and MIAO, Q. Acidity-activated charge conversion of ¹⁷⁷Lu-labeled nanoagent for the enhanced

photodynamic radionuclide therapy of cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2022, **14**(3), 3875–3884 ISSN 1944-8244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.1c21860>

ZHANG, Y., GU, X., HUANG, L., YANG, Y. and HE, J. Enhancing precision medicine: Bispecific antibody-mediated targeted delivery of lipid nanoparticles for potential cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024, **654**, 1-10. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123990](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123990)

ZHAO, J., YAO, L., NIE, S. and XU, Y. Low-viscosity sodium alginate combined with TiO₂ nanoparticles for improving neuroblastoma treatment. *International Journal of Biological Macromolecules* 2021, **167**, 921–933 Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135056](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135056)

ZHENG, W., WANG, L., JIAO, H., WU, Z., ZHAO, Q., LIN, T., MA, H., ZHANG, Z., XU, X., CAO, J., ZHONG, J., XU, J. and LU, B. A cost-effective, fast cooling, and efficient anti-inflammatory multilayered topological hydrogel patch for burn wound first aid. *Chemical Engineering Journal* 2023, 455, 140553 ISSN 1385-8947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140553>