



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

**ENERGETICKÝ ÚSTAV**

ENERGY INSTITUTE

**INHALÁTORY A AEROSOLY PRO LÉČBU  
BAKTERIÁLNÍCH ONEMOCNĚNÍ**

INHALERS AND NEBULIZERS FOR TREATMENT OF DISEASES CAUSED BY BACTERIA

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Jana Kánská**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. František Lízal, Ph.D.**

**BRNO 2022**



# Zadání bakalářské práce

Ústav: Energetický ústav  
Studentka: **Jana Kánská**  
Studijní program: Strojírenství  
Studijní obor: Základy strojního inženýrství  
Vedoucí práce: **doc. Ing. František Lízal, Ph.D.**  
Akademický rok: 2021/22

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

## **Inhalátory a aerosoly pro léčbu bakteriálních onemocnění**

### **Stručná charakteristika problematiky úkolu:**

Již delší dobu je za jedno z největších rizik pro společnost považována klesající účinnost antibiotik v důsledku jejich příliš častého a nesprávného užívání. Tato práce se zaměří na inhalátory pro podání léků na bakteriální onemocnění, přičemž důraz bude kladen zejména na technologie pro podávání tzv. bakteriofágů (virů, jež napadají bakterie). Bude ověřeno, která technologie je nejšetrnější a způsobí nejnižší deaktivaci léčiv. Student se také pokusí navrhnout technické úpravy, jež vedly k efektivnějšímu podání léčiv.

### **Cíle bakalářské práce:**

Rešerše inhalátorů a nebulizátorů vhodných pro podávání látek k léčbě bakteriálních onemocnění. Důraz bude kladen zejména na šetrnost k podávanému léčivu a možnost nebulizace bakteriofágů. Provést srovnání jednotlivých inhalátorů a nebulizátorů a popsat klíčové parametry, které negativně působí na léčivo při podání. Realizovat experiment, při němž bude porovnáno několik typů nebulizátorů s vhodným modelem léčiva. Zhodnotit získané poznatky a doporučit nejvhodnější systém pro inhalační léčbu bakteriálních onemocnění.

### **Seznam doporučené literatury:**

HINDS, W. C.: Aerosol Technology: Properties, Behavior, And Measurement Of Airborne Particles, Wiley-interscience, 1999, 504 p.

FINLAY, W.: The mechanics of inhaled pharmaceutical aerosols. An Introduction, Academic press, San Diego, 2001.

HICKEY, A. J.: Pharmaceutical inhalation aerosol technology, Marcel Dekker, New York, 2004.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2021/22

V Brně, dne

L. S.

---

doc. Ing. Jiří Pospíšil, Ph.D.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.  
děkan fakulty



## **ABSTRAKT**

Jedním z dnešních problémů, které ohrožují budoucnost lidstva, je stále se zvyšující bakteriální odolnost vůči antibiotikům. Je proto třeba hledat nový způsob léčby proti bakteriálním onemocněním. Možná alternativa k antibiotikům je léčba pomocí bakteriofágů.

Tato práce chce pomoci ke zvýšení účinnosti léčby pomocí bakteriofágů. V první části práce je obsažena rešerše inhalačních přístrojů a zaměřuje se obzvláště na přístroje nejvhodnější pro fagoterapii, tedy léčbu pomocí bakteriofágů. Dále je zde stručný přehled o fagoterapii a již proběhlých studiích na toto téma.

V experimentální části jsou popsány tři experimenty. V prvních dvou experimentech byly modelem léčiva lipozomy. Nejprve byly naměřeny jejich velikostní distribuce po nebulizaci za použití dvou typů nebulizátorů (tryskový a mřížkový). Dále bylo sledováno usazení lipozomů po nebulizaci v zjednodušeném modelu plic. Ve třetím experimentu byla třemi různými nebulizátory (dva tryskové a jeden mřížkový) provedena nebulizace fágových lyzátů. Znebulizované lyzáty byly zachyceny do sterilní zkumavky, aby mohla být následně vyhodnocena stabilita fágů po nebulizaci.

Experimentální část ukázala, že při nebulizaci lipozomů tryskový nebulizátor produkuje větší množství FPF než mřížkový nebulizátor. Dále bylo zjištěno, že při nebulizaci tryskovým nebulizátorem se do plic dostalo téměř stejné množství aerosolu jako se usadilo v náustku, přičemž velké množství také zůstalo v samotném nebulizátoru. Třetí experiment ukázal, že ani jeden nebulizátor zásadně nedegradoval fágový lyzát.

### **Klíčová slova**

Inhalátory, nebulizátory, aerosoly, bakteriofág, lipozomy

## **ABSTRACT**

One of today's problems that threaten the future of humanity is the ever-increasing bacterial resistance to antibiotics. It is therefore necessary to look for new treatments against bacterial diseases. A possible alternative to antibiotics is treatment with bacteriophages.

This work aims to help to increase the effectiveness of bacteriophage treatment. The first part of the thesis contains a survey of inhalation devices and focuses in particular on the devices most suitable for phage therapy, i.e. treatment with bacteriophages. Furthermore, there is a brief overview of phage therapy and the studies already conducted on this topic.

In the experimental section, three experiments are described. In the first two experiments, the model drugs were liposomes. First, their size distributions were measured after nebulization using two types of nebulizers (jet and mesh). Next, the deposition of liposomes after nebulization was monitored in a simplified lung model. In the third experiment, phage lysates were nebulized using three different nebulizers (two jet and one mesh). The nebulized lysates were captured in a sterile tube so that the stability of the phages after nebulization could be subsequently evaluated.

The experimental part showed that during liposome nebulization, the jet nebulizer produced more FPF than the mesh nebulizer. It was further found that during nebulization with the jet nebulizer, almost the same amount of aerosol entered the lungs as remained in the mouthpiece, with a large amount also remaining in the nebulizer itself. A third experiment showed that neither nebulizer substantially degraded the phage lysate.

### **Key words**

Inhalers, nebulizers, aerosols, bacteriophage, liposomes

## **BIBLIOGRAFICKÁ CITACE**

KÁNSKÁ, Jana. *Inhalátory a aerosoly pro léčbu bakteriálních onemocnění* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/140716>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Energetický ústav. Vedoucí práce František Lízal.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem *bakalářskou* práci na téma **Inhalátory a aerosoly pro léčbu bakteriálních onemocnění** vypracoval(a) samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu.

.....  
Datum

.....  
*Jméno a příjmení*

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji tímto vedoucímu práce doc. Ing. Františkovi Lízalovi, Ph.D. za jeho ochotu, rady a motivaci při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ondreji Mišíkovi za jeho ochotu a pomoc při řešení experimentální části práce. Děkuji firmě MB Pharma za poskytnutí fágových lyzátů a také za poskytnutí výsledků z titrace po jejich nebulizaci. Děkuji projektu GAČR 20-27653S.

## Obsah

1	Úvod.....	13
2	Dýchací systém .....	14
	2.1 Stručná charakteristika dýchacího systému.....	14
	2.2 Aerosoly .....	15
3	Inhalace .....	18
	3.1 Historie inhalace.....	18
	3.2 pMDI .....	19
	3.2.1 Dechem aktivovaný pMDI .....	20
	3.2.2 Spacery, ventily a obličejová maska.....	20
	3.3 DPI.....	21
	3.3.1 První generace DPI.....	22
	3.3.2 Druhá generace DPI.....	22
	3.3.3 Třetí generace DPI.....	24
	3.4 SMI.....	24
	3.5 Nebulizátory .....	25
	3.5.1 Tryskové nebulizátory .....	25
	3.5.2 Ultrazvukové nebulizátory.....	25
	3.5.3 Mřížkové nebulizátory .....	26
	3.5.4 Chytré nebulizátory .....	26
4	Bakteriofágy.....	27
	4.1 Představení bakteriofágů .....	27
	4.2 Životní cykly fágů .....	28
	4.2.1 Lytický cyklus .....	28
	4.2.2 Lyzogenní cyklus.....	28
	4.2.3 Antibiofilmové fágy.....	29
	4.3 Fagoterapie .....	29
	4.3.1 Inhalace fágů.....	29
5	Lipozomy .....	32
	5.1 Lipozomy obecně .....	32
	5.2 Lipozomy a bakteriofágy.....	32
	5.3 Inhalace lipozomů .....	32
6	Experimentální část.....	34
	6.1 Metodika.....	34
	6.1.1 Měření velikostní distribuce .....	34
	6.1.2 Dodání lipozomu do modelu dýchacího systému .....	35
	6.1.3 Nebulizace fágových lyzátů.....	36
	6.2 Výsledky.....	38
	6.2.1 Výsledky měření velikostní distribuce .....	38
	6.2.2 Výsledky měření dodání lipozomu do modelu plic.....	39
	6.2.3 Výsledky nebulizace fágových lyzátů .....	39
7	Diskuse.....	41

8	Závěr.....	43
	Seznam použitých zdrojů.....	44
	Seznam použitých symbolů.....	47
	Seznam použitých zkratek.....	48
	Seznam obrázků.....	49
	Seznam tabulek.....	51



## 1 Úvod

Bakteriální onemocnění se již desítky let léčí téměř výhradně antibiotiky. Velkým problémem je jejich časté a nesprávné užívání. V důsledku toho si bakterie na antibiotika vyvíjejí rezistenci a tím léky přestávají být účinné (Kaur et al. 2021). Bakteriální infekce způsobují 750 000 úmrtí za rok a předpokládá se, že za méně než 30 let budou způsobovat okolo 10 milionů úmrtí ročně (Loh et al. 2021).

Z tohoto důvodu se hledá vhodná náhrada antibiotik. Jednou z alternativ je fágová terapie, která byla dokonce před objevením antibiotik zkoumána (Wang et al. 2021). Fagoterapie využívá toho, že bakteriofágy jsou přirozenými parazity bakterií, kteří svého hostitele (i toho s rezistencí vůči antibiotikům) dokážou zabít. Ovšem když se začala antibiotika využívat, přestal být (hlavně v západních zemích) o fágovou terapii zájem. Proto stále není nasbírán dostatek dat, aby se mohla začít běžně využívat. V posledních letech se výzkum fágové terapie obnovuje a jeho výsledky prozatím vypadají velmi slibně (Chang et al. 2018).

Při srovnání fagoterapie a léčby antibiotiky nelze popřít výhody fagoterapie. Bakteriofágy jsou přirozeně se vyskytující se viry, které jsou schopné se vyvíjet společně s bakteriemi. Zároveň díky specifitě fágů je možná cílená léčba přímo na bakteriální patogeny. Nicméně hlavní překážky a výzvy je ještě stále třeba prozkoumat (Wang 2021).

Jedním ze způsobů podání fágů k léčbě je inhalace. Inhalátory jsou zařízení, která jsou schopna rozprášit práškovou nebo kapalnou formu léku na aerosoly. Tyto léčebné aerosoly vdechuje pacient do dýchacích cest. Výhodou inhalační léčby je (kromě toho, že se jedná o neinvazivní způsob léčby), že mohou sloužit i k léčbě jiných než respiračních onemocnění. Díky plicním kanálkům se inhalovaný lék může dostat do krve.

Tato práce si klade za cíl zhodnotit dostupná inhalační zařízení a jejich vhodnost pro fágovou terapii.

## 2 Dýchací systém

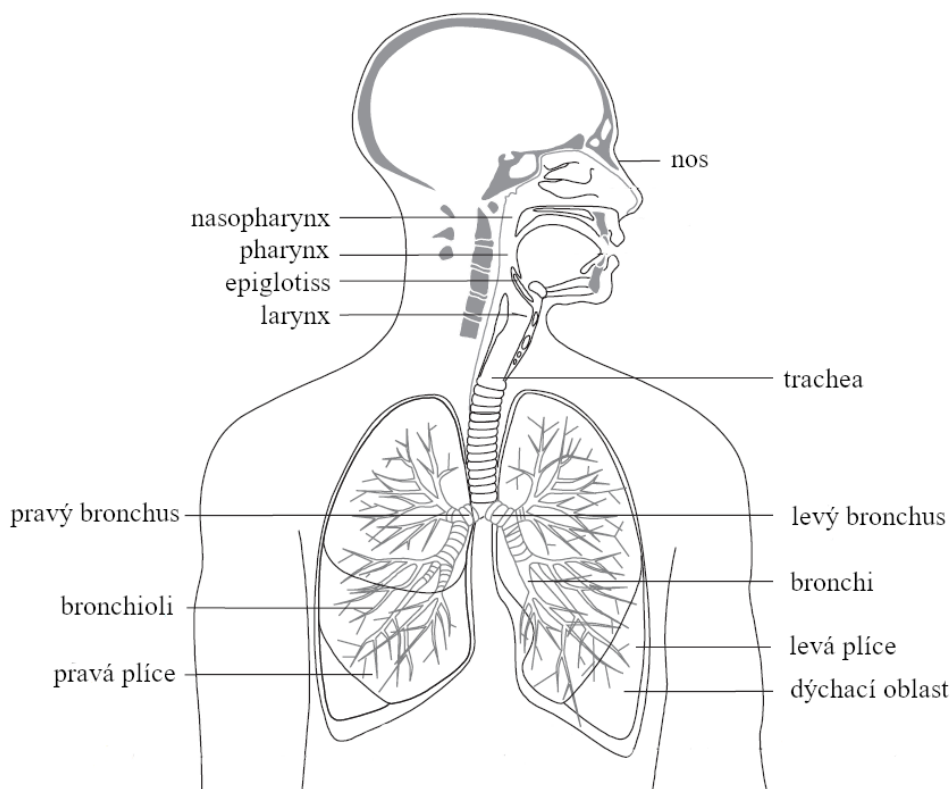
### 2.1 Stručná charakteristika dýchacího systému

Hlavní funkcí dýchacího systému je zásobování krve kyslíkem a odstraňování oxidu uhličitého z krve (Hickey 2004).

Dýchací systém je tvořen dýchacími cestami a plicemi, začíná v nose a končí v nejbližším alveolu. Část dýchacích cest umístěná v hlavě je označována jako horní cesty dýchací. Ty jsou tvořeny dutinou nosní a dutinou ústní, na ně navazuje hltan (farynx). Hltan můžeme dělit na dvě části, jedna spojuje ústa s hrtanem (orofarynx) a druhá spojuje dutinu nosní s hrtanem (nazofarynx). V dutině nosní dochází k přehřátí a zvlhčování vdechnutého vzduchu (Finlay 2001; Grim and Druga 2005; Trojan 2003).

Na horní cesty dýchací navazují dolní cesty dýchací, někdy také známé jako tracheo-bronchiální oblast. Tato oblast se skládá z hrtanu, který mimo jiné funguje jako uzávěra dolních cest dýchacích při polykání. Na něj je napojena průdušnice (trachea). Průdušnice se větví na průdušky (bronchi) a dále na průdušinky (bronchioli), kde dolní cesty dýchací končí. Trachea se větví na dvě hlavní průdušky. Ty se dále rozdělují do lalokových průdušek, z nichž jsou dvě v levé plicí a tři v pravé plicí. Lalokové průdušky se následně dělí na segmentální průdušky (Finlay 2001; Grim and Druga 2005).

Plice jsou párový orgán, který je tvořený celkem pěti neúplně oddělenými laloky. Součástí plic jsou větve bronchiálního stromu, které jsou obklopeny plicními sklípky. Vzduch je do plic přiváděn průduškami a ty se v plicích více než dvacetkrát větví a vytvářejí průdušinky (bronchioli). První se dělí na termiální bronchioly, dále na respirační bronchioly, větvení pokračují plicními chodbičkami (ductus alveolares) a uzavírají ho plicní sklípky (alveoli pulmonis). K vedení vzduchu slouží první dvě třetiny bronchiálních větví a zbylá třetina slouží k dýchání. Při inspiraci jsou plíce schopny pojmout až 5 litrů vzduchu (Finlay 2001; Grim and Druga 2005; Hickey 2004). Na *obrázku 1* je dýchací systém znázorněn graficky.



Obrázek 1: Hrubá struktura dýchacího systému. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Bisgaard et al. 2001)

## 2.2 Aerosoly

Aerosoly jsou plynné suspenze kapalných nebo pevných částic. Inhalační farmaceutické aerosoly (IPA, inhaled pharmaceutical aerosol) se používají k dodání terapeutických léčiv do plic k léčbě zejména plicních onemocnění. Takovýmto způsobem se léčí například astma. IPA také umožňují systémové podání léku, protože aerosoly se dostanou do krve skrze alveoly (Finlay 2001).

Léčba IPA má mnoho výhod, mezi ně například patří bezpečnost, pohodlnost léčby, rychlý a předvídatelný účinek, málo vedlejších účinků a potřeba menšího množství léku než u jiných způsobů léčby. Nevýhodami pak jsou variabilní a nepředvídatelné dávky u některých druhů inhalačních zařízení a také to, že některé léky pro systémovou léčbu jsou špatně absorbovány nebo dokonce inaktivovány (Finlay 2001).

Z léčebného hlediska je výhodné aerosoly přímo cílit na určité místo. Při léčbě astmatu jsou cílem malé a střední dýchací cesty a při systémové léčbě se částice musí dostat až do plicních sklípků. Aby mohla být léčba IPA cílená na určité místo v dýchacím systému, je důležité vzít v úvahu faktory, které ovlivňují, kde se částice uloží (Hickey 2004).

Jednou z nejdůležitějších vlastností IPA je velikost částic, ta velmi ovlivňuje jejich pravděpodobnost depozice<sup>1</sup> v dýchacím systému. Velké částice, větší než 5  $\mu\text{m}$ , se nejčastěji ukládají v horních cestách dýchacích a ve velkých dýchacích cestách. Tím je omezeno množství aerosolů, které se dostanou přímo do plic. Zatímco malé částice, menší než 2  $\mu\text{m}$ , se ukládají hlavně v alveolární oblasti. IPA velikosti 2 až 5  $\mu\text{m}$  se nejvíce uloží v centrálních a malých

<sup>1</sup> Depozice je usazení částic na povrchu.

dýchacích cestách. Produkované aerosoly jsou tradičně polydisperzní<sup>2</sup>, tedy když je uvedena velikost 3  $\mu\text{m}$ , představuje průměr částice, která je mediánem hmotnostního rozložení částic aerosolu (MMAD, the mass median aerodynamic diameter) (Darquenne 2022; Hickey 2004). Další důležitou veličinou, která charakterizuje aerosoly, je geometrická směrodatná odchylka (GSD, geometric standard deviation), která je určena vztahem (1).

$$GSD = \frac{MMAD}{D_{16}} \quad (1)$$

$D_{16}$  je aerodynamický průměr, přičemž 16 % hmotnosti aerosolů má průměr menší. Dále IPA charakterizuje FPF (fine particle fraction), které je definováno jako procentuální část aerosolů menších než 5  $\mu\text{m}$  (Newman 2022b).

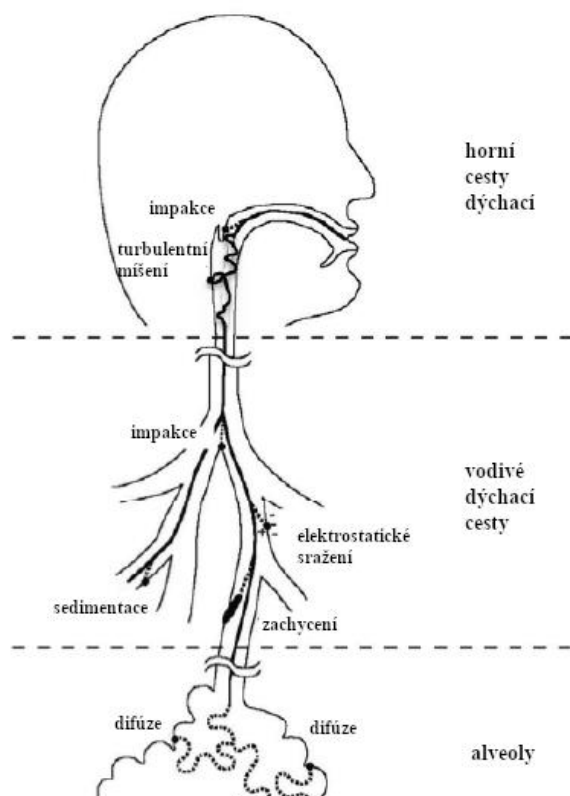
Aerosolové částice jsou často hygroskopické<sup>3</sup>, tudíž se jejich velikost při průchodu dýchacím systémem mění. Částice vodu vstřebávají nebo o ni přicházejí vypařováním. K tomu dochází snadno u kapalných forem léků nebo u léků, jejichž dodání je poháněno hnacím plynem a díky této vlastnosti se vypaří. Růst inhalovaných částic závisí na vlhkosti dýchacích cest a ovlivňuje jejich depozici. Rychlost hygroskopického růstu lze ovlivnit při přípravě léku, například léčiva v pevné formě lze vyrobit se sníženou rozpustností ve vodě (Darquenne 2022; Hickey 2004).

Inhalované částice procházejí složitou cestou dýchacího systému, během níž může jejich depozici ovlivnit několik základních mechanismů. Hlavními mechanismy jsou setrvačná (inerciální) impakce, gravitační sedimentace a Brownova difúze. V menší míře ovlivňují ukládání částic míšení vyvolané turbulentním prouděním, elektrostatická precipitace a intercepce (zachycení) (viz obrázek 2).

---

<sup>2</sup> Termínem polydisperzní rozumíme, že částice nemají stejnou velikost.

<sup>3</sup> Hygroskopie je schopnost látky snadno pohlcovat a udržovat vlhkost.



Obrázek 2: Mechanismy ukládání inhalovaných částic v dýchacím systému. Místa uložení jednotlivými mechanismy jsou ilustrativní, mohou se také vyskytovat v jiných místech. Obrázek byl převzatý a upravený ze zdroje (Darquenne 2022).

Inerciální impakce je významná zejména u inhalovaných částic větších než  $5 \mu\text{m}$ , když dojde k náhlé změně ve směru proudění. Částice se odchylojí od proudnic vzduchu, setrvačností se udrží ve svých vlastních trajektoriích, a mohou narazit na stěny dýchacích cest, čímž jsou odstraněny z toku. Pravděpodobnost, že k tomuto dojde, lze vyjádřit Stokesovým číslem:

$$S_{tk} = \frac{\rho_p \cdot d_p^2 \cdot u}{18 \cdot \mu \cdot d} \quad (2)$$

kde  $\rho_p$  vyjadřuje hustotu částice,  $d_p$  její průměr,  $u$  střední rychlost,  $\mu$  dynamickou viskozitu a  $d$  průměr dýchacích cest. Čím vyšší je Stokesovo číslo, tím je větší depozice.

Gravitační sedimentace ovlivňuje usazování částic o velikosti 1 až  $8 \mu\text{m}$ . Protože na inhalované částice působí gravitace, ovlivňuje to jejich proudění dýchacím systémem a zároveň se proti ní vytváří odpor vzduchu. Když jsou tyto dvě síly v rovnováze, padá částice tzv. sedimentační rychlostí. Ze vztahu (3) lze vidět, na kterých parametrech sedimentační rychlost závisí:

$$V_s = \frac{\rho_p \cdot d_p^2}{18 \cdot \mu} \cdot g \quad (3)$$

kde  $g$  vyjadřuje gravitační zrychlení a ostatní parametry jsou popsány výše (Finlay 2001).

Brownova difúze je způsobena náhodným pohybem částic, který vzniká jejich srážkami s molekulami plynu. Na rozdíl od předchozích dvou mechanismů se depozice difúzí zvyšuje se zmenšující se velikostí částic a je tak dominantním mechanismem ukládání částic menších než  $0,5 \mu\text{m}$ . K depozici difúzí dochází hlavně v alveolární oblasti plic, ale u velmi malých částic je významné uložení také v nose a orofaryngeální oblasti (Darquenne 2022).

Turbulence se vytváří v horních cestách dýchacích, pro které jsou typické velké změny v průřezu a velké zúžení v oblasti hlasivek. V důsledku turbulentního míšení se v těchto oblastech usazují částice na stěnách. Při generování částic aerosolu se jim často udělí elektrostatické náboje. Díky nabití částici může na stěnách dýchacích cest vzniknout zrcadlový náboj a tím se částice elektrostaticky přitahuje ke stěně. Tento mechanismus nemá příliš velký vliv na cílené ukládání IPA. Posledním mechanismem ovlivňujícím ukládání aerosolu v dýchacím systému je intercepce (zachycení). Částice se svým těžištěm pohybuje po proudnici, ale její část se dotkne stěny. Tím dojde k intercepce. Tento mechanismus je zvláště významný pro ukládání vláken v nose, malých dýchacích cestách a v alveolech (Darquenne 2022; Hickey 2004).

Při znalostech těchto mechanismů a vlastností IPA částic lze navrhnout takovou formu léku a inhalační zařízení, aby se konkrétní lék dostal na potřebné místo v dýchacím systému.

### 3 Inhalace

#### 3.1 Historie inhalace

První zmínky o inhalačních zařízeních jsou známy už ze starověkého Egypta. Nejstarší zmínka je z roku 1554 př. n. l. a dle ní byla inhalace prováděna pomocí nádoby s otvorem, ve kterém byl vložený rákos. Pacienti rákosem vdechovali výpary z bylin, které byly položeny na horkém kameni. Od roku 600 př. n. l. je známá inhalace aerosolů k léčbě astmatu a byla popsána ve spisech indických lékařů této doby. I v době Hippokrata (460-377 př. n. l.) bylo inhalační zařízení tvořeno nádobou s otvorem a rákosem (Stein and Thiel 2017).

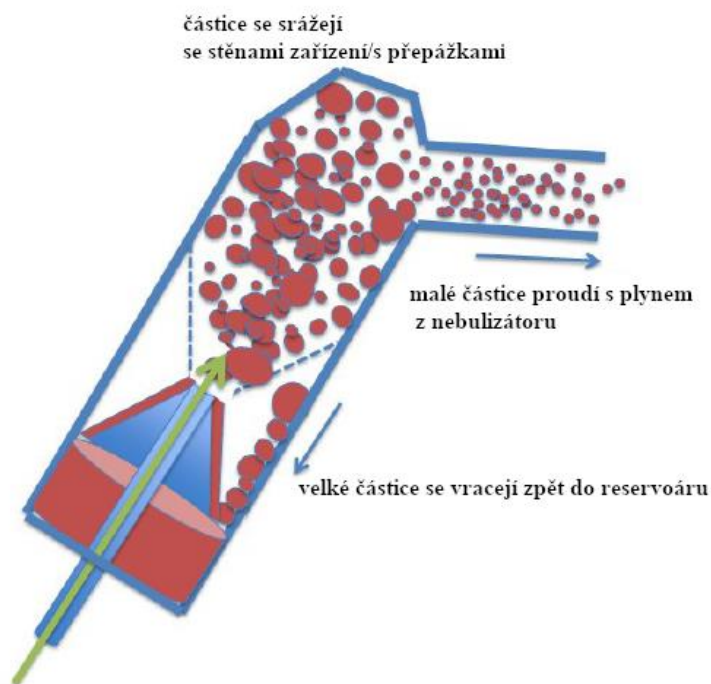
Ve 2. st. n. l. popsal řecký lékař Galén inhalaci léků ve formě prášku k úlevě od nosních a hrudních potíží. Pacienti vdechovali prášky myrhy a nutgallu přes ohnutý rákos. Dále existují záznamy ze 7. st. n. l. z Řecka, které doporučují při dlouhodobém kašli inhalaci bylinného léku. Lék se měl umístit na uhlí a výpary z něj pacienti vdechovali trychtýřem (Stein and Thiel 2017).

Díky novým možnostem ve výrobě a technice se na začátku průmyslové revoluce začala rozvíjet i inhalační zařízení a výroba léků, které se inhalovaly. V tomto období se začaly používat nové inhalační přístroje, nebulizátory a první inhalátory pro práškovou formu léku (DPI). V roce 1778 bylo představeno zařízení, které se skládalo z cínové nádoby s víkem a k víku se dala připojit ohebná trubice. Díky chytré konstrukci záklopky u náustku byli pacienti schopni inhalovat podobným způsobem, jako je to dnes u nebulizátorů (Stein and Thiel 2017).

Ve 40. letech 19. století se začala využívat inhalace anestetických plynů za pomoci obličejové masky. V chirurgii se jako anestetické plyny používaly éter a později chloroform, pro stomatologickou anestezii se využíval oxid dusný (Stein and Thiel 2017).

V roce 1852 Ira Warren uvedl na trh zařízení, které rozprašovalo vodný roztok dusičnanu stříbrného přímo do dýchacích cest. V tomtéž roce byl představen první známý DPI inhalátor. Další zajímavou inovací byl v roce 1899 vynález generátoru k atomizaci kapaliny, jako pohonná látka sloužil ethyl nebo methylechlorid. Tento vynález využíval teplo rukou ke zvýšení tlaku par kapalin. Pokud bylo dosaženo dostatečného tlaku, došlo k atomizaci přes malý otvor. V některých ohledech byl tento přístroj předchůdce aerosolového dávkovače (MDI, metered-dose inhaler) (Stein and Thiel 2017).

Významný pokrok ve vývoji inhalačních zařízení přišel s vynálezy atomizéru a nebulizátoru. Na rozdíl od atomizéru má nebulizátor přepážku, která zachycuje příliš velké částice a následně dochází v nebulizátoru znovu k jejich dispergaci (viz *obrázek 3*). Nebulizátor díky tomu poskytuje jemnější aerosoly, které se lépe uloží do plic (Stein and Thiel 2017).



Obrázek 3: Schéma principu funkce přepážek u nebulizátoru. Převzato a upraveno ze zdroje (Fink and Stapleton 2022)

V roce 1889 byl vynalezen Roe Carbolic Smoke Ball, byl tvořen dutou koulí z pryže o průměru 5 cm a 1,5 cm dlouhou tryskou z vulkanitu. Uvnitř koule byl prášek, který se dispergoval poté, co pacient zmáčkl gumový míček. Dispergovaný prášek se podobal kouři (Stein and Thiel 2017).

V současnosti slouží inhalace k léčbě mnohých plicních onemocnění, kterými jsou například astma nebo cystická fibróza. Tímto způsobem se mohou také léčit jiná onemocnění než plicní, protože plíce mohou sloužit jako vstup do zbytku těla, toho začínají vědci v posledních dvou desetiletích využívat (Ibrahim et al. 2015).

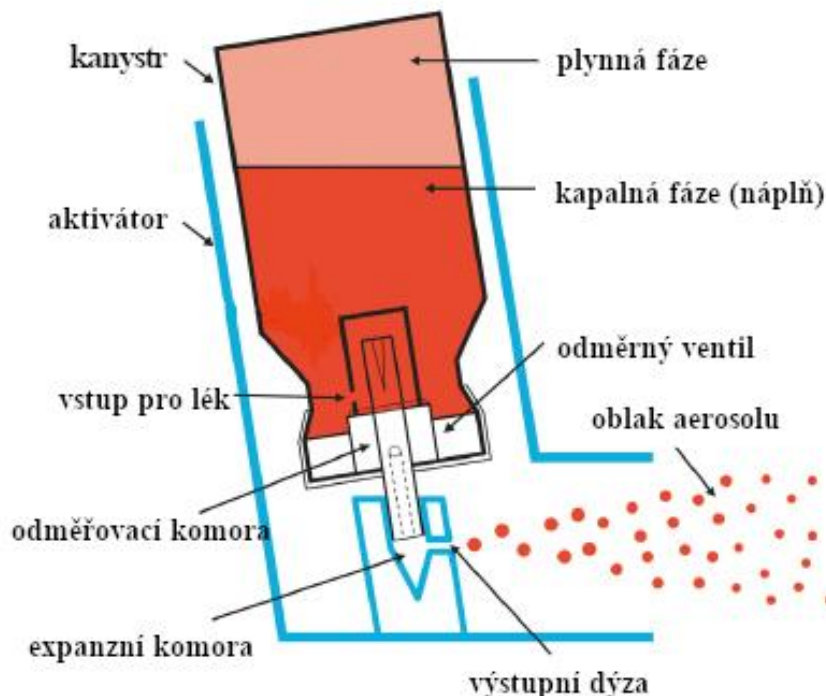
Dnes se pro aerosolovou léčbu používají aerosolové dávkovače (pMDI), inhalátory pro práškovou formu léku (DPI) a nebulizátory (Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015). Nelze najít ideální přístroj pro inhalaci, který by vyhovoval všem věkovým skupinám pacientů a byl vhodný pro všechny léky. Pro specifickou potřebu ale lze vybrat nejvhodnější inhalátor (Pedersen 1996).

### 3.2 pMDI

Myšlenka, že by se lék mohl podávat ve spreji, jako třeba lak na vlasy, vedla k vývoji aerosolového dávkovače pMDI. Byl představen v roce 1956 a nastal díky tomu průlom v léčbě respiračních onemocnění (Stein and Thiel 2017).

Konstrukce inhalátoru je složena z nádoby, dávkovacího ventilu, náustku a spouštěcího mechanismu (viz obrázek 4). Tyto inhalátory se používají při léčbě astmatu a CHOPN (chronická obstrukční plicní nemoc). Jsou to malá, přenosná zařízení. Pro správné uložení léku v plicích je důležité, aby měl pacient zvládnutou techniku inhalace. Musí se pomalu nadechnout, poté na pár sekund zadržet dech a následně pomalu vydechnout. K tomu musí umět koordinovat aktivaci inhalátoru s nádechem. pMDI totiž vytvářejí aerosol rychleji, než je ji pacient schopen vdechnout. Aerosoly se pohybují velmi vysokou rychlostí, až 100 km/hod. Problém s koordinací aktivace a inhalace se vyskytuje hlavně u dětí a starších pacientů

(Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015; Pedersen 1996; Smith and Parry-Billings 2003; Zhou et al. 2014).



Obrázek 4: Konvenční pMDI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Newman 2022a)

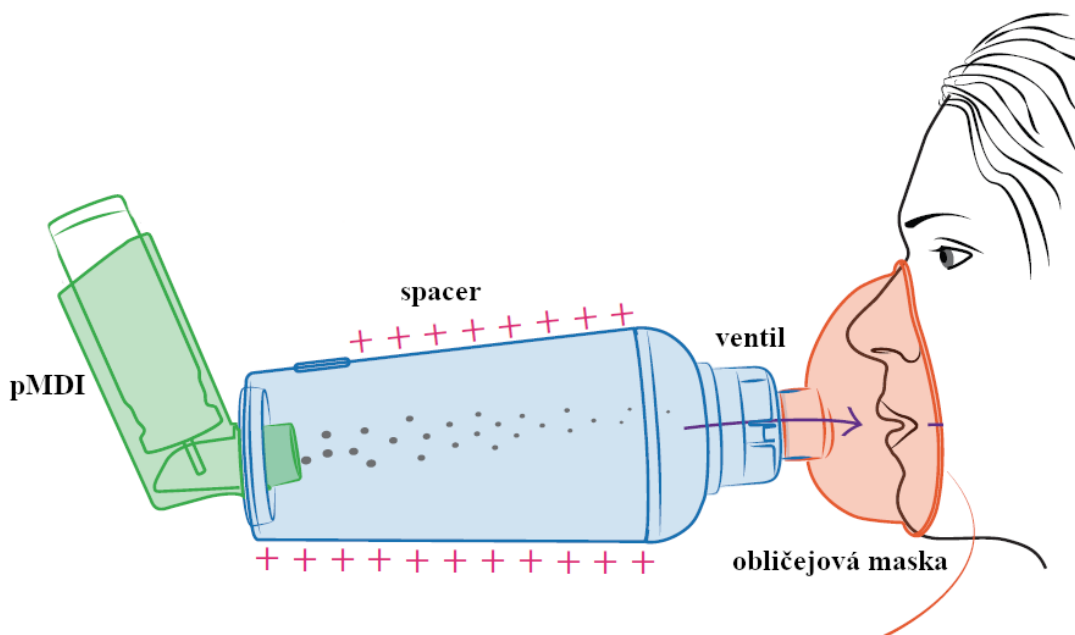
### 3.2.1 Dechem aktivovaný pMDI

Pro zlepšení účinnosti inhalátoru se vyvinul dechem aktivovaný pMDI, byl navržený tak, aby koordinoval aktivaci inhalátoru s dechem pacienta. Nebyl ale dostatečně přijat na trhu z důvodu velké nákladnosti a složitosti zařízení. Koordinaci dechu se snaží také zlepšit nedávný vývoj víka I-Breath, které je navrženo tak, aby se dalo nasadit na konvenční pMDI. Ve víku je více vzduchotěsných štěrbin, které jsou před aktivací uzavřeny. Díky deformovatelnému materiálu se při stlačení nádoby otevrou a umožní proudění vzduchu při inhalaci. Dle klinické studie se díky I-Breath podařila koordinace výrazně vylepšit (Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015; Zhou, Tang, Leung, Chan and Chan 2014).

### 3.2.2 Spacer, ventily a obličejová maska

Dalším řešením pro zlepšení léčby jsou přidané komponenty jako je spacer, jednocestný ventil nebo jejich kombinace. Spacer je komora, která zvětšuje vzdálenost mezi inhalátorem a ústy. Tyto součásti prodlužují dobu mezi aktivací zařízení a inhalací. Prodloužením času je pacientům umožněno dýchat zhluboka a pomalu, a tak dochází ke zvýšení depozice léků v plicích. Také pomáhají snížit množství usazených velkých částic v dutině ústní a hltanu. Nevýhodou je použitý materiál, plast, ten způsobuje nahromadění statického náboje na stěně spaceru a tím se snižuje jeho účinnost. Vzniku statického náboje můžeme zamezit použitím antistatických spacerů. VHC (valved holding chamber) je spacer s jednocestným ventilem, při nádechu se ventil otevírá, a to usnadňuje koordinaci. Studie ukázaly, že VHC je ještě účinnější než samotný spacer (Nikander et al. 2014; Zhou, Tang, Leung, Chan and Chan 2014). Pro děti do 3 let je doporučeno používat k inhalaci obličejovou masku, starší děti už by měly při inhalaci

raději používat náustek, protože léčba je pak více efektivní. Při používání obličejové masky se inhaluje nosem, a to není tak účinné jako vdechování aerosolu ústy (Devadason 2022). Na obrázku 5 je znázorněno, jak vypadá spojení pMDI, VHC a obličejové masky.



Obrázek 5: pMDI se spacerem, ventilem a obličejovou maskou. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Sanders and Bruin 2015)

### 3.3 DPI

DPI jsou přenosná, uživatelsky pohodlná zařízení, jejichž prostřednictvím se lék ve formě prášku dostává do dýchacích cest. Výroba prášku pro snadnou dispergaci je složitější. Na rozdíl od pMDI zde není potřeba koordinace nádechu pacienta s aktivací inhalátoru. Aby bylo dosaženo požadovaného léčebného účinku, je důležitá rovnováha mezi vnitřním odporem zařízení a silou nádechu pacienta (Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015; Islam and Gladki 2008). Čím vyšší je proudění vzduchu, tím lepší je disperze prášku, zároveň vysoké proudění vzduchu způsobí ukládání větší části léku v proximální části dýchacích cest. Pomalejší proudění vzduchu zase napomáhá uložení aerosolů hluboko do plic, ale částice jsou tímto pomalým proudem málo dispergovány, a tak hrozí, že budou na uložení v plicích příliš velké. Proto je dobrý inhalátor se středním odporem, u něj není disperze prášku tolik závislá na nádechu, ale závisí na vnitřním odporu DPI (Dal Negro 2015).

K přípravě práškové formy léku<sup>4</sup> se používá vícero metod, například mikronizace<sup>5</sup>, sušení rozprašováním (spray drying, SD) a SFD (spray freeze drying). SD je jednokroková metoda, při níž se kapalná suspenze pomocí plynného horkého sušicího média přemění na kapičky a ty jsou vystaveny horkému vzduchu. Její hlavní výhodou je jednotnost tvaru a průměru vytvořených částic. SFD je dvoufázová technologie a její proces je složitější a nákladnější než SD. V prvním fázi dochází k rychlému zmrazení rozprašovaného roztoku a ve druhé fázi

<sup>4</sup> Formou léku se myslí podoba léku (tableta, sirup, prášek atd.). Formulace léku je definována jako souhrn činností, které vedou ke složení léku, výrobnímu předpisu a konečnému designu.

<sup>5</sup> Mikronizace je nejběžnějším způsobem zmenšování částic na velikost vhodnou k inhalaci. Je to metoda poměrně destruktivní, protože částice vzniklé při výrobě léku vystavuje smykovému napětí a nárazu.

proběhne sublimace rozpouštědla (lyofilizace). SFD metoda je vhodná pro termosenzitivní léky. Nevýhodou SFD je, že vytvořené částice nejsou dostatečně malé a ke zmenšení pod 5 mikrometrů je zapotřebí další krok mletí (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018; Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

DPI lze rozdělit na tři generace.

### 3.3.1 První generace DPI

První generací DPI jsou jednodávkové inhalátory aktivované dechem. Lék je ve formě prášku a jako pomocná látka slouží laktóza. U těchto DPI je každá dávka léku vložena do samostatné želatinové kapsle, což poskytuje ochranu léku před vlhkostí. Inhalátor má kapacitu pouze na jednu kapsli, proto je nutné před každým použitím inhalátor naplnit. Jako příklad lze uvést Spinhaler nebo Rotahaler. (Chrystyn 2007; Islam and Gladki 2008)

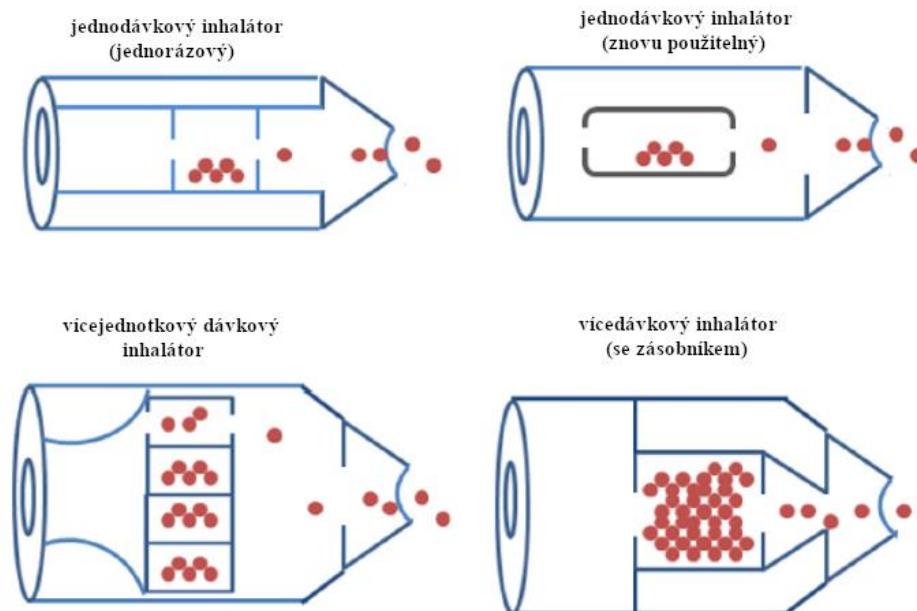
Inhalátor Spinhaler byl představen v roce 1967. Uvnitř inhalačního kanálu je vrtule, do jejíž blízkosti pacient vloží želatinovou kapsli. Při posunutí vačky jsou stěny kapsle propíchnuty dvěma jehlami. Když se pacient nadechne, vrtule se rychle otáčí a lék se dávkuje ve formě aerosolu (Chrystyn 2007; Timsina et al. 1994). V Rotahaleru je rozpúlení kapsle způsobeno kroutivým pohybem, kdy je vnitřní a vnější část inhalátoru otáčena vůči sobě navzájem. Když se pacient nadechne, prášek je unášen proudem vzduchu přes mřížku a vystoupí z inhalátoru ve formě aerosolu (Newman and Busse 2002). Jednodávkové inhalátory jsou nepohodlné, protože se po každé inhalaci musí odstranit zbytky kapsle a následně se zařízení znovu naplní. Z tohoto důvodu jsou nahrazovány vícedávkovými DPI (Chrystyn 2007).

### 3.3.2 Druhá generace DPI

Jsou to inhalátory, které obsahují více než jednu dávku léku. Existují dva druhy těchto inhalátorů, zařízení se zásobníkem a vícejednotková dávková zařízení. Pokud je prášek uložen v zásobníku, tak se jednotlivé dávky postupně odměřují při aktivaci inhalátoru. Prvním takovým DPI je Turbuhaler, který slouží k léčbě astmatu. Lék je zde ve formě měkké pelety z mikronizovaných částic. Když pacient otáčí základnou inhalátoru, je uříznuta dávka léčiva z pelety a připravena k inhalaci. Je důležité, aby při tomto úkonu byl inhalátor držěn ve svislé poloze, protože k naplnění dávkovací nádobky je důležitá gravitační síla. Prášek je dispergován turbulentním prouděním vzduchu vznikajících ve spirálovitých kanálcích náustku, vzniknou dostatečně jemné aerosoly k uložení do plic (Chrystyn 2007; Newman and Busse 2002).

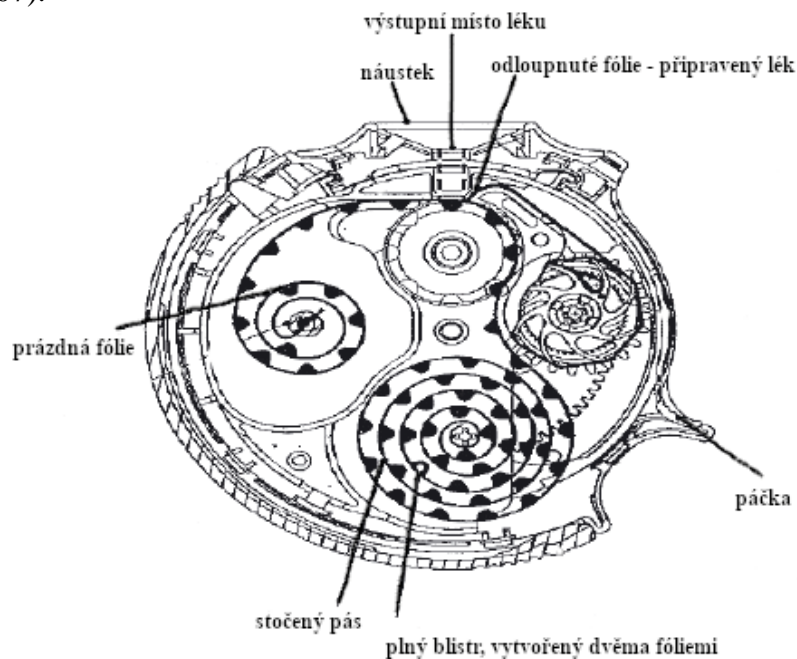
U vícejednotkových dávkovacích zařízení je dávka léku odměřena již při výrobě a uložena v blistrech, discích nebo páscích. Příkladem takového DPI je Diskhaler, který je vícedávkovou alternativou k Rotahaleru. Lék je doplněn o pomocnou látku, ta zlepšuje jednotnost dávky, protože se zvýší celková hmotnost prášku, a tak se zpřesní měření jedné dávky. Lék je uchováván v blistrech, což zvyšuje ochranu proti vlhkosti. Blistry jsou uloženy v discích, z nichž každý obsahuje 4 nebo 8 hliníkových blistrů. Když pacient zvedne víčko u náustku, propíchne se blistr, disk se pootočí a je nachystán další blistr k propíchnutí. Jednou z výhod Diskhaleru je to, že lze vidět, kolik dávek ještě zbývá (Chrystyn 2007; Newman and Busse 2002; Smith and Parry-Billings 2003).

Na *obrázku 6* jsou graficky znázorněny rozdíly mezi jednotlivými typy konvenčních DPI.



Obrázek 6: Schéma konvenčních DPI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015)

Dalším DPI tohoto typu je Diskus, ten byl navržen tak, aby poskytl lék až na jeden měsíc. Dávky léku jsou uloženy mezi dvěma fóliemi, které tvoří stočený pás uložený v inhalátoru. Takto je jednotlivě přichytáno 60 dávek prášku. Inhalátor je ovládaný posunutím páčky, ta posune pásem, když je blistr na svém místě, ozve se cvaknutí. Současně probíhá odloupení vrstev fólie od sebe a tím je připravena dávka k inhalaci. Také Diskus má počítadlo dávek (Chrystyn 2007).



Obrázek 7: Schéma Diskusu. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Chrystyn 2007).

### 3.3.3 Třetí generace DPI

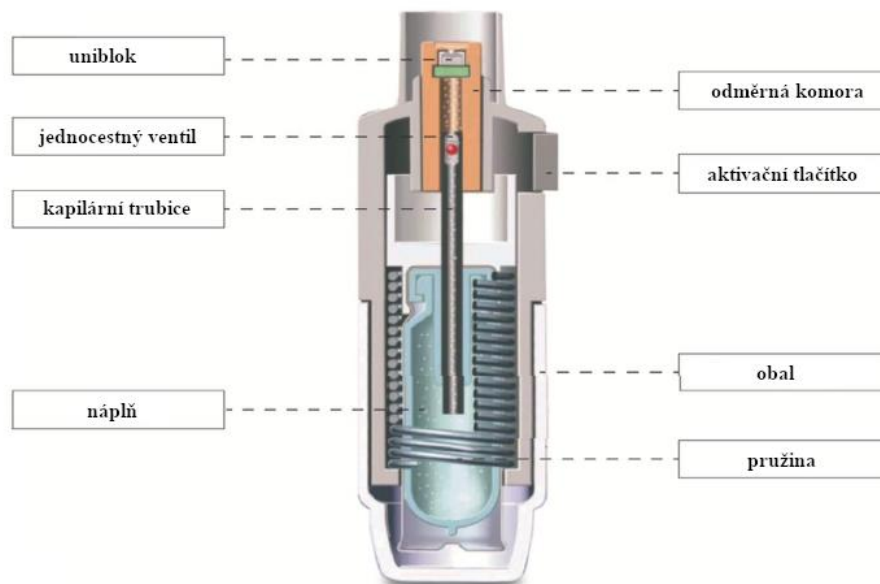
Třetí generací DPI jsou aktivní zařízení. Protože část pacientů není schopna vytvořit dostatečný inspirační průtok, došlo k vývoji aktivních DPI. K disperzi prášku využívají stlačený plyn, motorem poháněná kola nebo vibrace. Příkladem takového DPI je Spiros, který je poháněn baterií nebo inzulinový inhalátor Exubera. Exubera využívala stlačený vzduch z ručního pístu k disperzi prášku. Tento inhalátor už dnes není na trhu a hlavním důvodem je špatný marketing. Vzhledem k tomu, že zdrojem energie zde není samotná inhalace, není na ní závislá rychlost proudu vzduchu ani aerosolizace (de Boer et al. 2017; Islam and Gladki 2008).

### 3.4 SMI

Inhalátor Soft Mist Inhaler (SMI) Respimat obsahuje některé konstrukční prvky pMDI a při jeho vývoji bylo hlavními cíli vyhnout se použití poháněcích plynů, zmenšit závislost dispergace a usazování léků na pacientově nádechu a zlepšit dodání léků (Dekhuijzen et al. 2016; Iwanaga et al. 2019).

Zařízení funguje tak, že pacient otočí základnou inhalátoru o 180 ° a energie tímto pohybem vytvořená stlačí pružinu. To pohne kapilární trubicí do spodní polohy a tím je přesně definovaný objem roztoku nasáván do dávkovací komory. Po stisknutí tlačítka k uvolnění dávky mechanická síla pružiny tlačí kapiláru, s uzavřeným zpětným ventilem, do horní polohy. Tímto se roztok protlačí přes dvojité trysky unibloku a vytvořené proudy se sbíhají pod přesně určeným úhlem. Vytvoří se jemná mlha, která se pohybuje pomalu a v níž jsou výrazně zastoupeny jemné částice (Dalby et al. 2004; Dalby et al. 2011).

Jemná mlha se pohybuje pomaleji a vydrží mnohem déle než aerosolové mraky z jiných zařízení. Její rychlost je přibližně desetina rychlosti aerosolového oblaku vytvořeného v pMDI. Tvorba mlhy trvá asi 1,5 sekundy. To usnadňuje koordinaci aktivace a inhalace ve srovnání s pMDI. Uložení aerosolů v plicích je až o 50 % vyšší a uložení v orofaryngu nižší než u pMDI. Schéma SMI lze vidět na obrázku 8 (Dalby, Spallek and Voshaar 2004; Dekhuijzen, Lavorini and Usmani 2016).



Obrázek 8: Schéma SMI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Iwanaga, Tohda, Nakamura and Suga 2019)

### 3.5 Nebulizátory

Nebulizátory jsou inhalační zařízení, která vytvářejí aerosoly z roztoku nebo suspenze (Zhou, Tang, Leung, Chan and Chan 2014). Roztoky léčiva jsou na vodní bázi s pomocnými látkami, jejich objemy se pohybují od 1 do 3 ml pro většinu nízko objemových nebulizátorů. V současnosti jsou všechny roztoky sterilní a jsou baleny po jednotlivých dávkách (Dalby and Suman 2003). Vzniklé aerosoly mají velikost v rozmezí od 1 do 5  $\mu\text{m}$ . Prvními rozprašovači byla zařízení ze skla, která pacient ovládal ručním stlačením baňky. Baňka byla připojena k trubici, která přiváděla vzduch (Ocallaghan and Barry 1997). Nebulizátory jsou jednoduché pro použití, není zde tolik důležitá koordinace pacienta jako u jiných inhalačních zařízení. Když ho ale srovnáme s DPI nebo pMDI, tak je dražší, velký a léčba zabere více času. Nebulizátory se doporučují hlavně pro děti a starší pacienty (Pedersen 1996).

Nebulizátory dělíme na tryskové nebulizátory, ultrazvukové nebulizátory a mřížkové nebulizátory.

#### 3.5.1 Tryskové nebulizátory

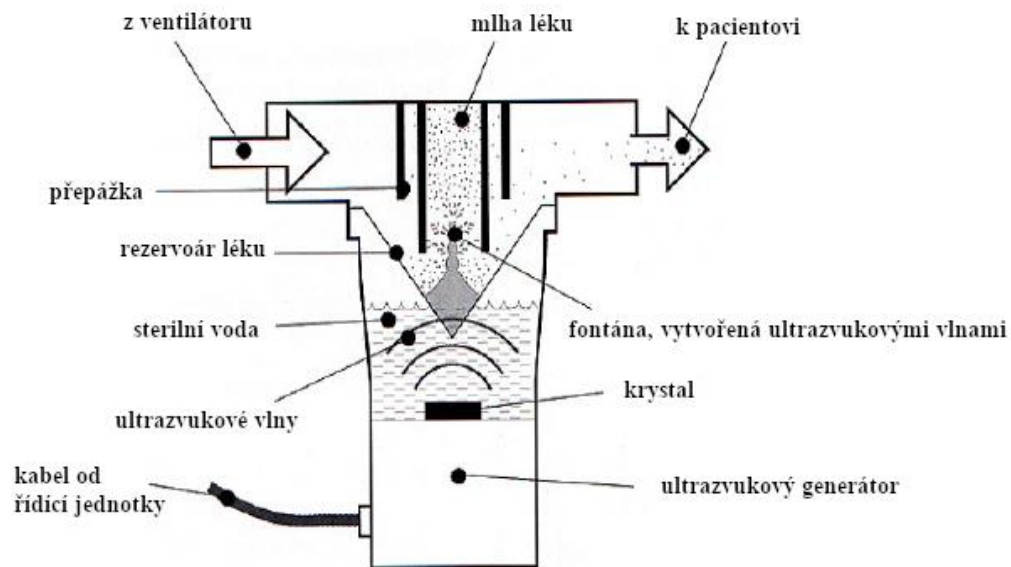
Nebulizátor pohání stlačený vzduch, který je buď v nádrži nebo přenosném kompresoru. K nebulizaci kapaliny dochází tak, že stlačený plyn je protlačován úzkou tryskou a vytváří se zde podtlak. Ten zvyšuje kapilaritu a způsobuje nasávání kapalného roztoku do proudu vzduchu. Smykovou silou se roztok atomizuje. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1, některé částice jsou příliš velké a je proto vhodná opětovná nebulizace, která je umožněna zachycením těchto částic o přepážky (Dalby and Suman 2003). Během nebulizace se teplota v nebulizátoru snižuje (Pedersen 1996). Jsou vhodné pro podávání léků, které nelze inhalovat pomocí MDI a DPI, jako jsou antibiotika nebo lipozomální formulace (Ari 2014). Konvenční tryskové nebulizátory jsou velmi neefektivní, protože část aerosolů odchází během výdechu do okolí (Ocallaghan and Barry 1997).

Zvýšení účinnosti lze dosáhnout přidáním vlnité trubice, kdy trubice funguje jako rezervoár. Stále je zde ale významná ztráta léku během výdechu. Lépe se daří zvýšit účinnost přidáním sběrného vaku, tehdy nebulizátor uvolňuje aerosoly pouze při vdechování. Aerosoly vytvořené během expirace jsou uloženy ve sběrném vaku a při dalším nádechu je pacient vdechne díky jednocestnému ventilu, který je umístěn mezi náustkem a sběrným vakem. Tímto se snižuje množství léku, které uniká do okolí. Příkladem tryskového nebulizátoru se sběrným vakem je Circulaire (Ari 2014).

Dalšími úpravami vznikl dechem posílený nebulizátor, toto zařízení uvolňuje během nádechu přes jednocestné ventily více aerosolu. Příkladem takového nebulizátoru jsou PARI LC Plus nebo Nebutech (Ari 2014). U dechem aktivovaných tryskových nebulizátorů je tok nádechu snímán a díky tomu dokáže nebulizátor aplikovat aerosol pouze při nádechu. Tak se snižuje plýtvání léku během inhalace, ale kvůli tomu se doba inhalace prodlouží. Takovýto nebulizátor je například AeroEclipse, ten dokonce pacientovi ukazuje pomocí posuvného tlačítka, kdy je nebulizátor aktivovaný (Ari 2014).

#### 3.5.2 Ultrazvukové nebulizátory

Tento nebulizátor využívá k nebulizaci rychle vibrující piezoelektrický krystal (viz *obrázek 9*). Ultrazvukové vibrace z krystalu se přenášejí na povrch roztoku, kde vytváří stojaté vlny. Z hřebenů těchto vln se uvolňují aerosoly (Ocallaghan and Barry 1997). Ultrazvukové nebulizátory dělíme na velkoobjemové a maloobjemové, přičemž k inhalaci léků jsou vhodné pouze maloobjemové. Velkou nevýhodou ultrazvukových nebulizátorů je neschopnost dispergovat viskózní roztoky a také to, že degradují látky citlivé na teplo, protože se roztok během dávkování zahřívá. Příkladem tohoto nebulizátoru je Profile Therapeutics, který neustále monitoruje dech pacienta, a tak může předpovídat nástup dalších inhalací (Ari 2014; Dalby and Suman 2003).



Obrázek 9: Schéma ultrazvukového nebulizátoru. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Fink and Stapleton 2022)

### 3.5.3 Mřížkové nebulizátory

Jsou to malé přenosné nebulizátory. Mřížkové nebulizátory využívají mikropumpy k nebulizaci, léky v tekuté formě se protlačí otvory v síťce, a tak se vytvoří aerosoly. Výhodou tohoto typu nebulizátoru je schopnost nebulizace malých objemů léku a malý zbytkový objem. Také jsou zde sníženy problémy se zahříváním, a tak jsou vhodné pro dodávání suspenze, lipozomů nebo nukleonové kyseliny. Jsou účinnější než tryskové nebulizátory. Jejich velkou nevýhodou je, že viskózní léky a suspenze mohou ucpat mřížku a její čištění je obtížné (Ari 2014).

Existují dva typy mřížkových nebulizátorů, aktivní a pasivní. Aktivní mřížkové nebulizátory využívají stahování a roztahování piezoelektrického prvku při působení elektrického proudu. Tímto se rozvibruje mřížka, která je v kontaktu s lékem a vytvoří se aerosol. Příkladem takového zařízení je Aeroneb nebo eFlow. U pasivních mřížkových nebulizátorů se vytvářejí pasivní vibrace v perforované desce s 6000 otvory (Ari 2014).

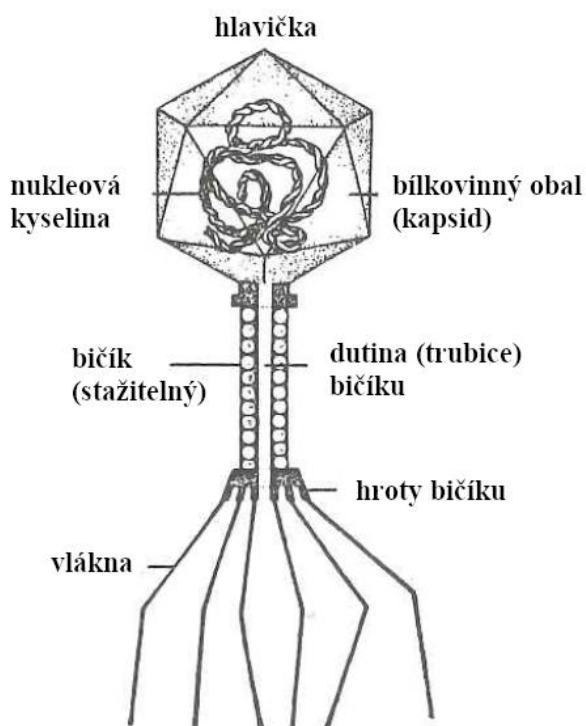
### 3.5.4 Chytré nebulizátory

Chytré nebulizátory využívají technologii adaptivního dodávání aerosolu AAD® (adaptive aerosol delivery). Tato technologie analyzuje průběh dechu pacienta, aby mohla určit, kdy vypustit aerosoly během inhalace. Funguje to tak, že zařízení sleduje změny tlaku vzduchu během prvních tří dechů a díky tomu určí správnou chvíli, kdy v inhalačním cyklu podat lék. Dech je monitorován po celou dobu inhalace a nebulizátor se případným změnám přizpůsobuje. Tímto se snižují ztráty léku během výdechu. Zařízení je také schopné poskytnout zpětnou vazbu o účinnosti léčby. Příkladem takového zařízení je I-neb (Ari 2014).

## 4 Bakteriofágy

### 4.1 Představení bakteriofágů

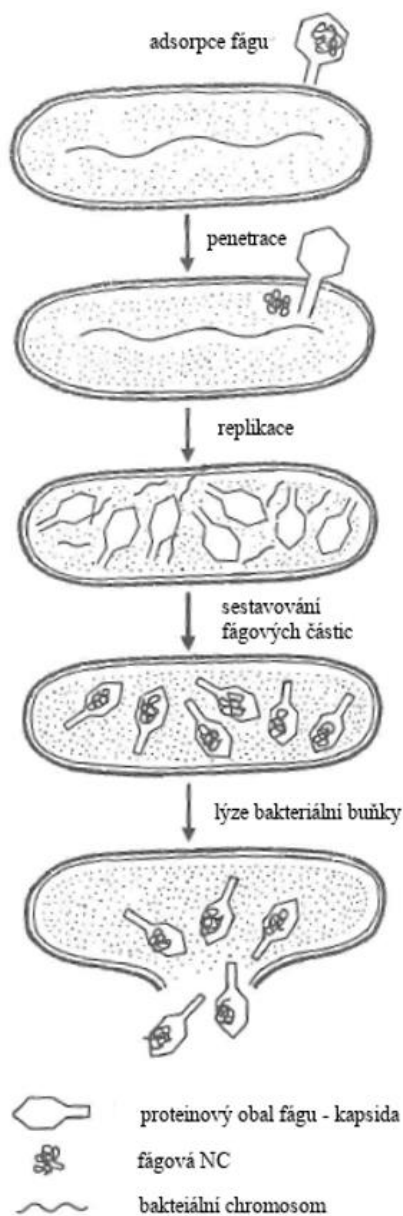
Bakteriofágy (nebo též fágy) jsou přirozené viry napadající hostitelské bakterie (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018). Jejich velikost se pohybuje od 20 do 200 nm, tedy jsou menší než bakterie. Stavba bakteriofága je složena z mnohostěnné kapsidy, ve které je uložena nukleová kyselina, DNA nebo RNA. Sudé fágy, označené T2, T4 a T6, mají na kapsidu připojen dutý bičík. Konkrétně u fágu T4 je vnější část bičíku tvořena stažitelnými bílkovinami a vnitřní část nestażitelnými, vlivem toho se bičík může stahovat a natahovat (Rosypal 1994). Jak konkrétně vypadá fág T4 lze vidět na *obrázku 10*. Pokud mají fágy plně vyvinutý bičík, jedná se o fágy T4 a T6, mají na něm připojena bičíková vlákna a hexagonální destičku s hroty. DNA T-sudých fágů je díky svému složení chráněno proti účinku bakteriálních restričních enzymů (Šilhánková 2008). Většina bakteriofágů má podobný tvar, odlišují se délkou hlavičky, bičíkem, některé druhy ani bičík nemají. Existují také bakteriofágy, které jsou vláknité, mají vzhled dlouhých tyček a uvnitř je nukleová kyselina (Rosypal 1994). Fág byl objeven ve 20. letech 20. století a následně začal výzkum jeho léčebných účinků. Poprvé ho k léčbě využil kanadský mikrobiolog Félix d'Hérelle. Výsledky prvotních fagoterapií nebyly vůbec špatné, ale větší popularitu získala léčba antibiotiky. Výzkumy nadále probíhaly ve východní Evropě, hlavně kvůli zdejšímu nedostatku antibiotik, avšak na západě se ve výzkumu nepokračovalo. Na počátku 80. let 20. století zájem o léčbu fágy znovu vzrostl, hlavně z toho důvodu, že bakterie si vyvíjí stále rychleji rezistenci na nová antibiotika. Bakteriální rezistence vzniká hlavně proto, že pacienti antibiotika nadužívají a zneužívají. V roce 2020 zařadila světová organizace WHO antimikrobiální rezistenci mezi 10 největších globálních hrozeb veřejného zdraví. Fagoterapie by mohla být vhodnou alternativou k léčbě antibiotiky (Doss et al. 2017; Farr et al. 2014; Kaur, Kumari, Negi, Galav, Thakur, Agrawal and Sharma 2021).



Obrázek 10: Struktura a tvar bakteriofága T4. Obrázek je převzatý ze zdroje (Rosypal 1994)

## 4.2 Životní cykly fágů

Fágy mohou mít dva různé životní cykly lytický cyklus a lyzogenní cyklus. Podle životního cyklu fága rozlišujeme dva různé druhy napadení bakteriálních hostitelů (Doss, Culbertson, Hahn, Camacho and Barezzi 2017).



Obrázek 11: Lytický cyklus fágů.  
Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Klaban 2011)

### 4.2.1 Lytický cyklus

Lytický cyklus konají virulentní bakteriofágy (Rosypal 1994). Fág je schopen rozpoznat specifické receptory hostitelských buněk, které jsou uloženy na jejich povrchu. Naváže se na receptor a injektuje svůj genetický materiál do bakteriální buňky. Injektace probíhá tak, že DNA fága vnikne trubičkou bičíku do nitra bakteriální buňky. Kapsida fága zůstane vně buňky. Následně započne fágová replikace, která je umožněna enzymy a molekulárními stavebními bloky hostitelské buňky. Vytvoří se přibližně tolik fágů, kolik se v hostitelské buňce vytvořilo kopií genetické informace původního fága. V jedné buňce se může vytvořit až několik set nových fágů (Doss, Culbertson, Hahn, Camacho and Barezzi 2017; Farr, Choi and Lee 2014; Rosypal 1994). Fágové potomstvo je uvolněno z hostitele buněčnou lýzou<sup>6</sup>. Po uvolnění fágu se spustí sekundární infekce, tedy napadení bakterií fágovým potomstvem (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018). Celý lytický cyklus je pro lepší názornost zobrazen na *obrázku 11*. Seberekopie fágů umožňuje nahromadění fágového titru<sup>7</sup>, což je nezbytné k zadržení bakteriální populace (Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

### 4.2.2 Lyzogenní cyklus

Lyzogenní cyklus konají mírné bakteriofágy. Rozdíl mezi virulentním a mírným fágem je takový, že mírný fág buňku nemusí zlyzovat. Pokud ji nezlyzuje je to proto, že jeho DNA se nereplikuje, ale začlení se do chromozomu buňky. Profág, takto vytvořený fág, se stane součástí chromozomu hostitelské buňky a spolu s chromozomem se replikuje. Hostitelské buňky nesoucí profága zlyzují pouze, když se z chromozomu profága uvolní. Uvolnění proběhne buď spontánně nebo po aktivaci různými faktory (Rosypal 1994). Lyzogenní fágy jsou, na rozdíl od virulentních fágů, pro fágovou terapii nevhodné (Klaban 2011).

<sup>6</sup> Jedná se o rozklad buněk v důsledku rozpadu jejich vnější membrány.

<sup>7</sup> Titr představuje v klinické laboratoři množství určité látky.

### 4.2.3 Antibiofilmové fágy

Kromě konvenčního způsobu zabíjení bakterií existují fágy, které jsou schopny zabránit vzniku biofilmu a umí narušit již vzniklé biofilmy. Tyto fágy jsou vybaveny látkami, konkrétně depolymerázami a endolyziny, které jsou pro rozpuštění tuhé biofilmové matrice potřebné. Fágům je díky tomu umožněno proniknout do hlubších oblastí za biofilmem a následně zabít bakterii klasickým mechanismem. Difuze fágů může být v takových vrstvách pomalá (Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

### 4.3 Fagoterapie

Fagoterapie má ve srovnání s léčbou antibiotiky spoustu výhod. Fágy se stejně jako bakterie vyvíjejí a snaží se s nimi ve vývoji udržet krok. Izolování nových fágů je časově méně náročné než vývoj nového typu antibiotik. Rezistence bakterií vůči fágům je asi desetkrát pomalejší než vůči antibiotikům. Fág je infekční i ve velmi drsném prostředí a pokračuje ve své replikaci, dokud výrazně nesníží hustotu populace bakterií. Léčba způsobuje minimální vedlejší účinky. Většina druhů fágů má dost specificky určeno, jaký typ patogenní bakterie napadne. Tím se snižuje riziko poškození přirozené mikroflóry lidského organismu. Dále jsou fágy schopné proniknout do biofilmů, což je problematický stav například u cystické fibrózy. Specifita fágů ale může být i nevýhodou, ta se dá vyřešit směsí více fágů, takzvanými fágovými koktejly. Fágové koktejly snižují pravděpodobnost, že si na ně bakterie vytvoří rezistenci a zároveň zvyšují rozsah léčitelnosti. Nevýhodou fagoterapie může být, že lidský organismus může fágy identifikovat jako cizí antigeny i přes to, že nejsou přímými patogeny eukaryotických buněk<sup>8</sup>. Když taková situace nastane, organismus produkuje protilátky, které fágy neutralizují. Dále není žádoucí přílišná produkce bakteriofágů, protože na rozdíl od antibiotik časem nedegradují, a tak vysoké množství fágů by mohlo mít nežádoucí dopad na životní prostředí (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018; Doss, Culbertson, Hahn, Camacho and Berekzi 2017).

#### 4.3.1 Inhalace fágů

Nejčastěji byly dosud prováděny studie dodání fágů pomocí nebulizátorů. Jsou uvažovány i další možnosti jako inhalace pomocí DPI a pMDI, avšak tyto možnosti nejsou zatím dostatečně prozkoumány (Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

##### 4.3.1.1 Inhalace nebulizátory

Většina výzkumů v rámci fagoterapie byla především zaměřena na nebulizaci kapalných forem léku. Je to z toho důvodu, že příprava kapalných forem bakteriofágů je relativně jednoduchá a tyto formy jsou snadno atomizovány (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018). Také mohou být skladovány v chladničce až několik let bez významných ztrát (Loh, Gondil, Manohar, Khan, Yang and Leptihn 2021). Nevýhodou při nebulizaci je mechanické namáhání způsobené vysokofrekvenčními vibracemi nebo tlačení vzduchu, tepelné namáhání při renebulizaci a smykové napětí při impakci. To může poškodit strukturu fága a tím snížit jeho životaschopnost a infekčnost. Při nebulizaci tryskovým nebo mřížkovým nebulizátorem může dojít k oddělení ocasu od těla fága, a tudíž není fág schopen infekce (Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

Studie (Turgeon et al. 2014) uvedla, že dispergace fágů nebulizátory vedla k poškození integrity fágů nutné k infekci. Dle jiné studie (Astudillo et al. 2018), kde probíhala nebulizace

---

<sup>8</sup> Eukaryotické buňky jsou buňkami lidského těla, mají pravé jádro a jsou vývojově vyspělejší typem buňky. Bakterie jsou tvořeny prokaryotickou buňkou, která je jednodušší a její genetická informace je uložena v nukleoidu.

mřížkovým nebulizátorem, měly fágy po nebulizaci prázdnou kapsidu. V této studii srovnávající tři typy nebulizátorů, tryskový, s vibrující mřížkou a se statickou mřížkou, byla sledována morfologická stabilita fága myoviridae<sup>9</sup> proti bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky ukázaly, že vhodnějším přístrojem pro tento konkrétní případ je nebulizátor s mřížkou, kde zdegradované fágy tvořily 50-60 %. Zatímco při dispergaci tryskovým nebulizátorem bylo zničeno 83 % fágů. (Carrigy et al. 2017) ve svém výzkumu použili k nebulizaci antiturbekolózního fága D29 tryskový nebulizátor, mřížkový nebulizátor a SMI. I zde se ukázalo, že největší snížení fágového titru způsobuje tryskový nebulizátor. Další studie (Leung et al. 2019), zkoumala odolnost fágů z různých morfologických tříd proti tryskovému nebulizátoru. Ukázalo se, že životaschopnost fága po nebulizaci závisí na délce ocasu. U fágů s krátkým ocasem byla po nebulizaci ztráta životaschopných fágů zanedbatelná, naopak dlouhoocasí fágové měli významnou ztrátu. Z toho plyne, že dlouhoocasí fágové jsou velmi citliví na namáhání, které způsobuje tryskový nebulizátor. Tento škodlivý účinek lze minimalizovat přítomností organické kapaliny (ve zdroji nebylo blíže specifikováno) v nebulizačním pufru<sup>10</sup> (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018; Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

Z toho lze vidět, že výběr ideálního nebulizátoru se liší dle konkrétního typu fága. Studie ale ukazují, že pro morfologicky stabilní fágy jsou jak tryskové, tak mřížkové nebulizátory ideální volbou k nebulizaci, a dokonce dosáhnou uložení hluboko v plicích (Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

#### 4.3.1.2 Inhalace v práškové formě

Při vývoji léčiv na bázi proteinů se fágy zpracovávají na suché prášky. Léky v práškové formě jsou vhodné pro snadnou přepravu a dlouhodobější skladování, protože proteiny jsou více stabilní v suchém než kapalném stavu. Výhodou práškové formy je, že při výrobě aerosolů nedochází k mechanickému namáhání jako u nebulizace. Zároveň jsou proteiny ve vodním prostředí vystaveny napětím způsobeným mícháním, změnou pH nebo povrchovým napětím. Tomu se při pevné formě vyhneme (Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018; Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021; Zhang et al. 2021).

Jak již bylo popsáno v kapitole 2, k přípravě práškové formě léku se využívá více metod. Při SD jsou fágy vystavovány vysoké teplotě, což může ovlivnit životaschopnost termosenzitivních fágů. I přesto je SD široce využívaná technika, která produkuje dostatečně jemné částice pro depozici v plicích a je levnější než SFD. Pro zlepšení odolnosti fágů proti smykovému a tepelnému napětí se do formulace léku přidává laktóza, která také zvyšuje dlouhodobou stabilizaci fágů v pevném stavu. SFD je vhodnou metodou pro fágy citlivé na teplo, protože neprobíhá za vysokých teplot jako SD. Proces lyofilizace je ale delší, což může vést ke ztrátě titrů. Dalším úskalím této metody je nutnost mletí, které může fága mechanicky namáhat. Nicméně SFD bylo prokázáno jako skvělá metoda pro stabilizaci fágů v pevném skupenství pro dlouhodobé skladování. TFFD (Thin film freeze-drying) je pokročilá technologie, která využívá velmi rychlé zmrazení k získání křehkých matricových prášků obsahujících aktivní léky. Formulace léku se zmrazí vytvořením tenkého filmu při teplotách od -70 až -180 °C. Zároveň TFFD eliminuje smykova napětí, která vznikají u jiných technologiích pro výrobu suchého prášku. Proto je žádoucí metodou pro uchování tepelně a mechanicky citlivých fágů (Chang et al. 2019; Chang, Wallin, Lin, Leung, Wang, Morales and Chan 2018; Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021; Zhang, Soto, Ghosh and Williams 2021).

<sup>9</sup> Tato bakterie způsobuje například zánět močových cest nebo zánět středního ucha.

<sup>10</sup> Pufry jsou tlumivé roztoky, které se podílejí na udržení pH prostředí.

#### **4.3.1.3 pMDI a SMI**

Ve studii (Hoe et al. 2014) byla pomocí pMDI dodávána do plic suspenze dvou fágů myoviridae. Ztráta titru byla zanedbatelná, ale do plic se dostane pouze 10 – 20 % dávky (Wang et al. 2021).

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3.1.1 Carrigy et al. porovnávali účinnost dodání fága D29 pomocí mřížkového nebulizátoru, tryskového nebulizátoru a SMI. Bylo zjištěno, že SMI dodá fágy s minimální ztrátou titru a rychleji než nebulizátory (Wang et al. 2021).

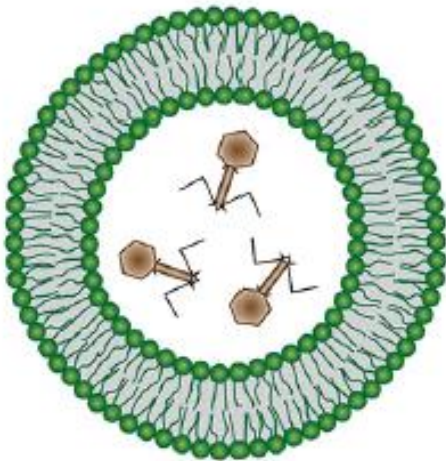
Toto jsou jedny z mála nalezených zmínek o fagoterapii s pMDI a SMI, tedy lze vidět, že inhalace fágů pomocí MDI a SMI inhalátorů zatím nebyla dostatečně prozkoumána.

## 5 Lipozomy

### 5.1 Lipozomy obecně

Lipozomy jsou sférické vezikuly, tvořené fosfolipidovými dvojrstvami a vodní bází uvnitř. Existují tři typy lipozomů: malé jednodamelární lipozomální vezikuly o průměru kolem 100 nm, velké jednodamelární lipozomální vezikuly ve velikosti průměru od 200 do 800 nm a mnoholamelární vezikuly, které se skládají z více soustředných dvojrstev o průměru od 500 do 5000 nm. Lipozomy se připravují za použití lipidů, ať už přirozeně se vyskytujících nebo syntetických. Pro zvýšení tuhosti lipidových dvojrstev často obsahují cholesterol. Lipozomy jsou díky svým fyzikálně chemickým a biologickým vlastnostem univerzální pro dodávání léčiv. Jsou vhodnými vezikulami pro hydrofilní léky, které se umístí do vodní báze uvnitř lipozomu a pro lipofilní léky, ty se uloží do lipidových dvojrstev. Jsou biokompatibilní a jejich velikost, povrchové vlastnosti a stabilita lze upravit dle potřeby (Ponkshe et al. 2021).

Na základě strukturních modifikací lze lipozomy rozdělit do tří generací. Lipozomy první generace jsou složeny hlavně z fosfolipidů a cholesterolů. Tyto lipozomy jsou biologicky odbouratelné a s nízkou toxicitou. Vykazují značná omezení, například únik léčiv z lipozomových vezikul. Lipozomy druhé generace se vyznačují modifikovaným povrchem. Společným znakem lipozomů první a druhé generace je, že jsou pasivní. Lipozomy třetí generace jsou naopak aktivní a cílicí (Mehta et al. 2020).



Obrázek 12: Lipozomy sloužící jako vezikuly pro bakteriofágy: Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Loh et al. 2021)

### 5.2 Lipozomy a bakteriofágy

Zapouzdření bakteriofágů do lipozomů (viz obrázek 12) je jedna z možností, jak ochránit fágy při celém procesu inhalace. Cílem zapouzdření je produkce monodisperzních částic, které se během aplikace neshlukují. Zapouzdření fága ho ochraňuje proti vnějšímu prostředí, jako je působení tělních tekutin, enzymů, nízké pH a funguje jako aktivní platforma pro uvolňování fágů po delší dobu. Bakteriofágy jsou hydrofilní a lipozomy s nimi prokázaly vysokou biokompatibilitu, aniž by to ovlivnilo jejich efektivitu a počet během zapouzdření. Lipozomy napodobují biologické membrány, a to jim například umožňuje pronikat různými bariérami hostitelské tkáně. Studie ukázaly, že zapouzdření fágů do lipozomů jim umožnilo získat přístup do eukaryotické buňky k intracelulárním patogenům<sup>11</sup>, což je u volných fágů komplikované (Kaur, Kumari, Negi, Galav, Thakur, Agrawal and Sharma 2021; Loh, Gondil, Manohar, Khan, Yang and Leptihn 2021; Wang, Xie, Zhao, Zhu, Yang and Liu 2021).

### 5.3 Inhalace lipozomů

Nejčastěji používaným inhalačním zařízením pro lipozomy jsou nebulizátory, protože DPI, pMDI a SMI pojmu menší množství aerosolů než nebulizátory. I přesto by se i tato zařízení dala využít při léčbě, která nevyžaduje velké množství léku. Například DPI, které dispergovali

<sup>11</sup> Intracelulární patogeny jsou paraziti buněk, kteří se rozmnožují a žijí uvnitř těchto buněk.

lipozomy připravené pomocí SD, produkovali částice s vysokým FPF. Předpokladem byla rehydratace částic ve vodném prostředí plic. Z dosavadních výzkumů vychází pro lipozomy nejlépe tryskový nebulizátor a nejméně vhodným se ukázal ultrazvukový. Důležitým kritériem k úspěšné léčbě je stabilita lipozomů, problémem je, že smykové síly při nebulizaci mohou způsobovat fragmentaci lipozomů se ztrátou hydrofilního materiálu. Mřížkové nebulizátory s velkými otvory méně narušují stabilitu lipozomů než tryskové nebulizátory. Ke stabilitě také přispívá zahrnutí cholesterolu a fosfolipidů do lipozomů (Rudokas et al. 2016).

## 6 Experimentální část

Byly provedeny tři různé experimenty. U prvních dvou byly modelem léčiva lipozomy, protože jak již bylo zmíněno výše, jsou vhodnými vezikulami pro bakteriofágy. V prvním experimentu byly naměřeny velikostní distribuce nosičového lipozomového systému a lipozomového systému obarveného fluoresceinem. Tento experiment byl proveden jako přípravný k druhému experimentu z důvodu, zda by výsledky rozložení v modelu plic byly u roztoků ekvivalentní. Zároveň byl proveden pro srovnání, jaké jsou rozdíly mezi velikostmi částic vyprodukovaných tryskovým a mřížkovým nebulizátorem.

V druhém experimentu byl model léčiva ve formě lipozomového systému obarveného fluoresceinem nebulizován do modelu plic a cílem bylo zjistit, jak bude vypadat rozložení léku po usazení v tomto modelu. Roztok byl obarven pro snadnější vyhodnocení sedimentace. Fluorescein je pro tento experiment vhodným barvivem, ze zdravotního hlediska se jedná o čistou látku a jde snadno vyčistit.

U posledního experimentu byl modelem léku fágový lyzát<sup>12</sup> proti bakterii *P. aeruginosa*. Cílem tohoto experimentu bylo porovnat účinky nebulizace pomocí tří různých nebulizátorů na životaschopnost fágů.

### 6.1 Metodika

#### 6.1.1 Měření velikostní distribuce

Velikostní distribuce aerosolu byly zjišťovány pomocí přístroje The Aerodynamic Particle Sizer® (APS™) 3321, TSI. U každého roztoku bylo naměřeno ze statistického důvodu 10 vzorků, přičemž měření jednoho trvalo 30 sekund. Nebulizátor byl držen v takové vzdálenosti od vstupu APS, aby nebyl vstup zařízení příliš zahlcen částicemi a nebyly tímto ovlivněny výsledky. Nejprve byly naměřeny 3 vzorky vzduchu okolního prostředí a poté 7 vzorků nebulizovaného roztoku. Pro srovnání, jak velké částice produkují různé druhy nebulizátorů (viz obrázek 13), byla měřena velikostní distribuce aerosolu vytvořeného nebulizátorem Aerogen® Solo (aktivní mřížkový nebulizátor) a Pari® LC Sprint Star (tryskový nebulizátor). Aerogen® Solo stačilo pouze připojit ke zdroji elektrické energie, ale do Pari® LC Sprint Star musel být vháněn stlačený vzduch z kompresoru. Tlak kompresoru byl nastaven tak, aby měl nebulizátor průtok 4,5 l/min (výrobce nebulizátoru udává průtok 3 – 6 l/min). Při nastavování průtoku byl použit průtokoměr. Protože byl tryskový nebulizátor použit i při dodávání lipozomového systému do plic, byla u něj naměřena velikostní distribuce nejen čistého lipozomového systému, ale také obarveného fluoresceinem.

---

<sup>12</sup> Fágový lyzát vzniká při lytické infekci bakteriofágů v tekutém médiu. Jde o roztok obsahující virové částice, zbytky membrán bakterie a vylitý buněčný obsah.



Obrázek 13: Zleva Pari LC Sprint Star a Aerogen Solo. Obrázky jsou převzaty ze zdrojů (PARI 2022; POLYMED® 2022)

### 6.1.2 Dodání lipozomu do modelu dýchacího systému

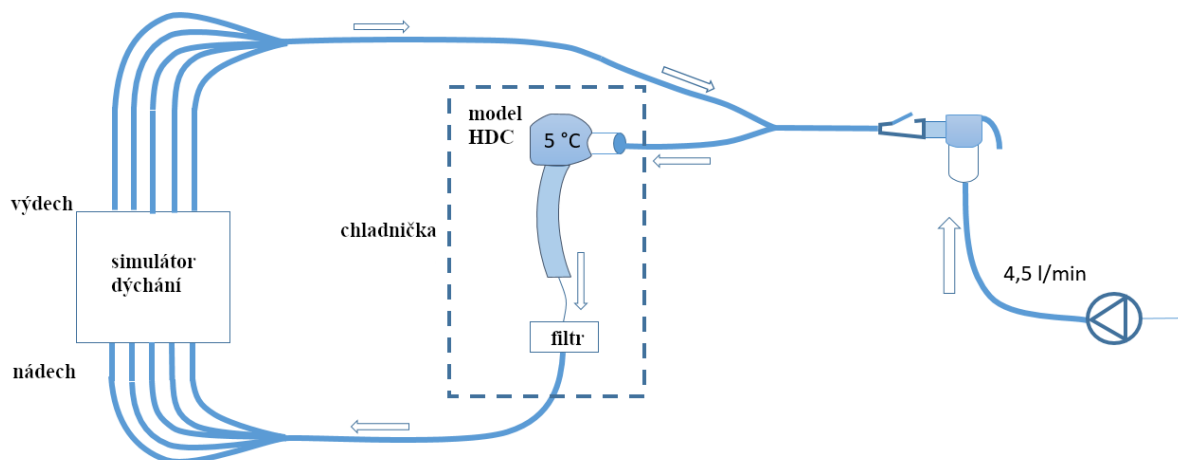
Při této části experimentu byl znovu použit nebulizátor Pari® LC Sprint Star, v jehož kanystru bylo 2,5 g roztoku lipozomového systému obarveného fluoresceinem. Nebulizátor byl přímo spojen s náustkem a ten byl napojen na model. Zjednodušený model dýchacího systému byl složen ze tří částí, trachey, horních cest dýchacích a filtru, který představoval plíce. Tento model byl uložen v lednici, protože při obvyklé teplotě laboratoře (viz *tabulka 1*) by se aerosoly odpařovaly a tím by byl ovlivněn výsledek měření.

Dýchací systém byl zapojen na simulátor dýchání, přičemž přes model plic vedl pouze směr nádechu a výdech šel mimo systém (bylo provedeno 100 nádechů). Důvodem takového způsobu zapojení bylo, že nádech a výdech jinak ovlivňují usazování částic, při výdechu například dochází ke clearanci<sup>13</sup>. Je vhodnější měřit nádech a výdech odděleně, zvláště když se používá zjednodušený model plic, kde jsou plíce nahrazeny filtrem. Anatomie plic má totiž také vliv na to, jaké množství aerosolu se vydechne. Výdech byl ale veden přes nebulizátor k simulaci vlivu výdechu pacienta na roztok, protože i výdech do nebulizátoru ovlivňuje roztok (*konzultace O. Mišík, duben 2022*). Schéma zapojení při měření je znázorněno na *obrázku 14*. V *tabulce 1* jsou uvedeny laboratorní podmínky.

Tabulka 1: Okolní podmínky v laboratoři

Veličina	hodnota
Teplota v laboratoři	24,2 °C
Teplota modelu	4,1 °C
Relativní vlhkost	21,5 %
Tlak	99,53 kPa

<sup>13</sup> Clearance je odstranění usazených inhalovaných částic, nastává například při výdechu, kdy se částice vrací zpět.



Obrázek 14: Schéma zapojení při měření, autor: Ing. Ondřej Mišík

Po provedení simulace dýchání byl model plic vyjmut z chladičky a rozebrán na jednotlivé segmenty. Každý segment byl propláchnut destilovanou vodou, aby se z něj dostaly usazené aerosoly. Koncentrace částic aerosolů v roztoku byly následně vyhodnoceny v chemické laboratoři.

### 6.1.3 Nebulizace fágových lyzátů

Nebulizace fágových lyzátů byla provedena třikrát a pokaždé jiným nebulizátorem. Byly použity již zmíněné Pari® LC Sprint Star, Aerogen® Solo a Innospire® Elegance, což je tryskový nebulizátor. Cílem experimentu bylo znebulizovat fágové lyzáty a zachytit je do sterilní zkumavky, aby mohla být následně vyhodnocena stabilita fágů po nebulizaci.

Experiment probíhal jinak pro tryskové nebulizátory a jinak pro mřížkový nebulizátor. Protože je do tryskových nebulizátorů vháněn vzduch z kompresoru, musí být zajištěn také jeho odchod, proto není možné nebulizátor přímo spojit se zkumavkou. Tryskové nebulizátory byly napojeny na trať vytvořenou z hadic, která byla ukončena skleněnou trubicí vedoucí do sterilní zkumavky. Tato zkumavka byla uložena v kádince plné ledu a studené vody (viz obrázek 15) dle metody Cipolla a Gondy. Do Pari® LC Sprint Star byl (stejně jako u předchozích částí experimentu) vháněn vzduch z kompresoru a jeho tlak byl nastaven tak, aby byl průtok 4,5 l/min. Pro Innospire® Elegance byl využit originální kompresor značky Phillips® Respirationics a jeho průtok byl přibližně 6,2 l/min. Takto bylo každým nebulizátorem znebulizováno 10 ml roztoku, protože bylo potřeba zachytit alespoň 3 ml roztoku ve zkumavce a velká část aerosolu unikala do okolí. Tratičky byly vytvořeny podle vzoru tratiček provedených ve studii (Astudillo, Leung, Kutter, Morales and Chan 2018).

Aerogen® Solo byl pouze spojen se zkumavkou, jak lze vidět na obrázku 16. Bylo znebulizováno 5 ml roztoku, protože aerosol neunikal do okolního prostředí, a tudíž ho bylo více zachyceno ve zkumavce (bylo zachyceno 4 ml roztoku).



Obrázek 15: Fotografie trati při použití tryskových nebulizátorů (zde konkrétně Pari LC Sprint Star)



Obrázek 16: Fotografie zachycování znebulizovaného roztoku mřížkovým nebulizátorem  
V tabulce 2 jsou uvedeny okolní podmínky v laboratoři při nebulizaci fágových lyzátů.

Tabulka 2: Okolní podmínky v laboratoři

Veličina	Hodnota
Relativní vlhkost	25,10 %
Teplota	22,2 °C
Tlak	98,06 kPa

Zachycené znebulizované fágové lyzáty byly ihned po zachycení uloženy do chladicího boxu a po dokončení experimentu zavezeny do laboratoře, kde byl každý vzorek titrován. Poprvé byly vzorky titrovány ihned po přivezení do laboratoře a podruhé za 24 hodin.

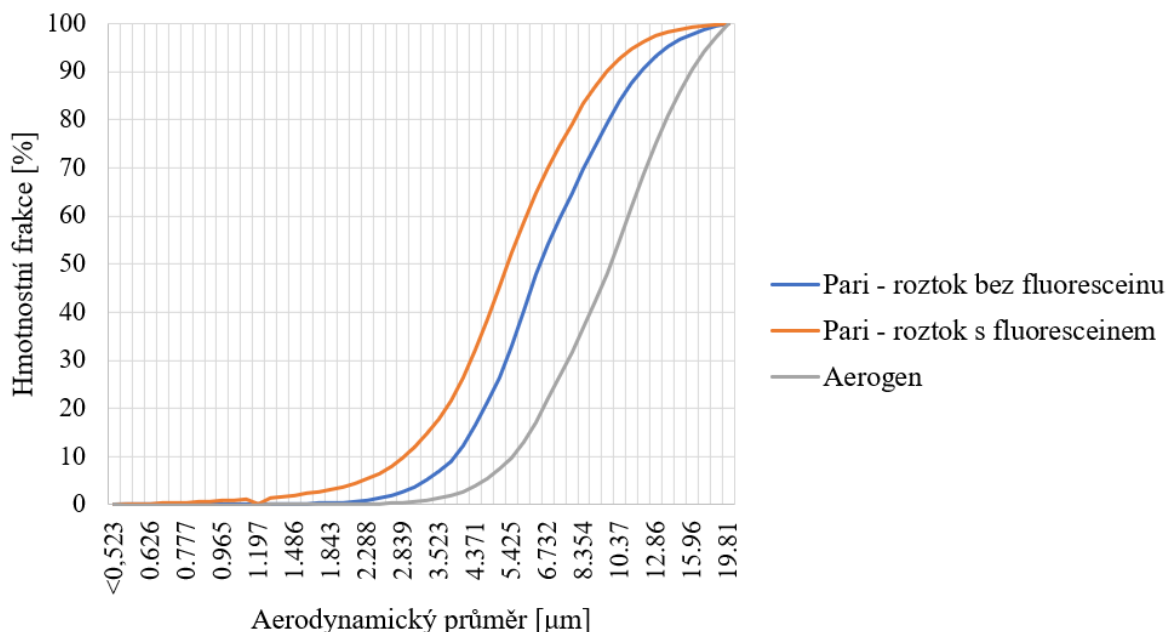
## 6.2 Výsledky

### 6.2.1 Výsledky měření velikostní distribuce

Z APS byla použita data, kde bylo pro každý aerodynamický průměr uvedeno jeho hmotnostní zastoupení. Při vyhodnocování výsledků byly nejprve od každého vzorku odečteny naměřené hodnoty z okolního prostředí (respektive průměr ze 3 vzorků vzduchu okolního prostředí). Následně byl každý vzorek vyhodnocen v procentech velikostních tříd, tedy kolik procent z celkové hmotnostní distribuce je zastoupeno každou velikostní frakcí. Výsledky byly převedeny na kumulativní distribuci (viz *obrázek 17*), protože se z ní lépe určují potřebné parametry. Těmito parametry byly MMAD, GSD a FPF, vzorce pro jejich výpočet jsou uvedeny v kapitole 2.2 a výsledné hodnoty jsou uvedeny v *tabulce 3*. Jde zde krásně vidět porovnání, že Pari® LC Sprint Star produkoval větší množství FPF než Aerogen® Solo.

Tabulka 3: Výsledky měření na APS

Aerogen Solo	roztok bez fluoresceinu	
MMAD [ $\mu\text{m}$ ]	9,84 $\pm$ 0,41	
GSD [ $\mu\text{m}$ ]	1,60 $\pm$ 0,03	
FPF [%]	5,45 $\pm$ 1,01	
Pari LC Sprint Star	roztok bez fluoresceinu	roztok s fluoresceinem
MMAD [ $\mu\text{m}$ ]	6,44 $\pm$ 0,35	5,33 $\pm$ 0,51
GSD [ $\mu\text{m}$ ]	1,48 $\pm$ 0,01	1,55 $\pm$ 0,03
FPF [%]	21,21 $\pm$ 3,52	38,58 $\pm$ 9,19



Obrázek 17: Kumulativní distribuce aerosolů

### 6.2.2 Výsledky měření dodání lipozomu do modelu plic

Jak lze vidět v *tabulce 4*, pokud srovnáme hmotnostní rozložení vdechnutých částic aerosolu v jednotlivých segmentech, přibližně stejná část se uloží v plicích a zůstane v náustku. Pro léčbu je žádoucí, aby se co možná největší množství aerosolu uložilo v plicích. Je ale nežádoucí, aby se tak velké množství aerosolu zachytilo v náustku.

V tomto vyhodnocení není zahrnuta část lipozomového systému, která zůstala v nebulizátoru. Z vážení prázdného nebulizátoru, naplněného nebulizátoru a nebulizátoru po proběhlém experimentu bylo zjištěno, že v zařízení zůstalo 70 % hmotnosti roztoku.

Tabulka 4: Výsledky měření na modelu plic

jednotlivé segmenty	hmotnostní procenta [%]
náustek	44,49
trachea	4,28
HDC	5,34
filtr	45,78

### 6.2.3 Výsledky nebulizace fágových lyzátů

Nejlepší výsledky byly dosaženy nebulizátorem Innospire® Elegance, zde byl titr nebulizací snížen o polovinu. Nejmenší titr byl zjištěn u PARI® LC Sprint, kde došlo ke zmenšení o téměř jeden řád (viz *tabulka 5*).

Tabulka 5: Výsledky titrace fágových lyzátů

Vzorek	Titř (PFU/ml) <sup>14</sup>	Titř po 24 h (PFU/ml)
Původní lyzát	4,97E+10	2,47E+10
Aerogen Solo	1,23E+10	1,69E+10
PARI LC Sprint	8,67E+09	6,23E+09
Innospire Elegance	2,53E+10	1,80E+10

---

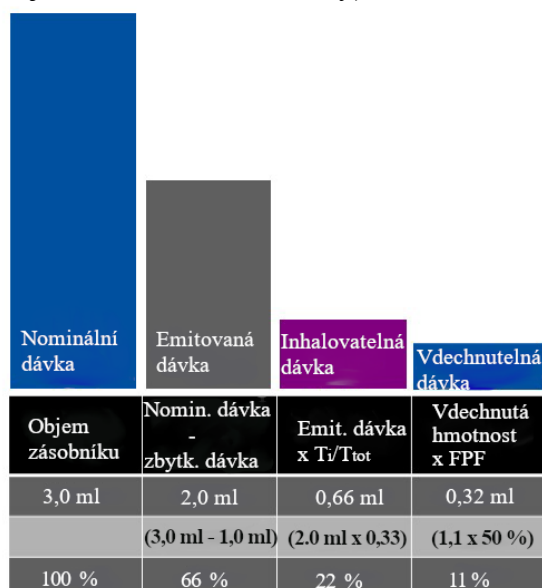
<sup>14</sup> PFU (plaque forming units) je měřítkem množství virů, které mohou lyzovat buňky bakterií (ScienceDirect 2022)

## 7 Diskuse

V první části experimentu byly porovnány velikostní distribuce lipozomového systému při použití nebulizátorů Pari LC Sprint Star a Aerogen Solo. Jak lze vidět v *Tabulce 2*, Pari LC Sprint Star vyprodukoval větší množství FPF. Pravděpodobně to je způsobeno tím, že mřížkový nebulizátor má přesně dané velikosti otvorů, které tvoří síť. A velikost částic vytvořených tímto nebulizátorem hodně závisí na tom, jaké vlastnosti má nebulizovaný roztok (Fink and Stapleton 2022). Zatímco u tryskového nebulizátoru se příliš velké částice znovu nebulizují díky naražení do přepážek v nebulizátoru. Tudíž lze předpokládat, že pokud by bylo žádoucí dodat co největší množství léku přímo do plic, byl by tryskový nebulizátor vhodnějším zařízením.

Dále byly porovnány velikostní distribuce čistého nosičového lipozomového systému a nosičového lipozomového systému označeného fluoresceinem. Jejich MMAD se příliš neliší, tudíž by neměl být významný rozdíl mezi jejich ukládáním v dýchacím systému.

V druhé části experimentu byla pozorována depozice lipozomového systému obarveného fluoresceinem v modelu dýchacího systému. Při porovnání hmotnostních frakcí v jednotlivých segmentech se ukázalo, že 45,8 % hmotnosti znebulizovaných lipozomů se usadilo ve filtru. Vzhledem k výsledkům z měření velikostní distribuce se takovéto usazení dalo předpokládat. Na druhou stranu se velké procento aerosolů (44,5 %) usadilo v náustku. To je pravděpodobně způsobeno typem dechového cyklu v tomto experimentu, protože přes náustek byl veden i výdech. Není zde stabilní průtok vzduchu, ale vzduch se zde točí. V literatuře se o tomto jevu nepíše. Z průběžného vážení nebulizátoru bylo zjištěno, že v nebulizátoru zůstalo 70 % hmotnosti roztoku. Jak již bylo napsáno výše, jedná se o tryskový nebulizátor a u tohoto typu nebulizátoru může zbytkový objem<sup>15</sup> tvořit velké procento původní dávky (z původní dávky 3 ml mohou zbytkový objem tvořit až 2/3 dávky). Na *obrázku 18* lze vidět, že při použití



*Obrázek 18: Maloobjemový tryskový nebulizátor – kolik procent roztoku pacient inhaluje. Nominální dávka udává objem roztoku v nebulizátoru před nebulizací. Emitovaná dávka udává rozdíl nominální dávky a zbytkového objemu. Inhalovatelná dávka udává emitovanou dávku vynásobenou podílem času nádechu ku času dýchacího cyklu. Vdechnutelná dávka udává vdechnutou hmotnost vynásobenou procenty, které tvoří FPF. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Fink and Stapleton 2022)*

<sup>15</sup> Zbytkový objem je množství původní dávky v roztoku, která zůstala v inhalátoru. Někdy se mu také říká mrtvý objem (Fink 2022).

maloobjemových tryskových nebulizátorů se do dýchacích cest z původní dávky dostane pouze 11 % (vdechnutelná dávka). To by mohlo vysvětlovat množství aerosolu, které při experimentu zůstalo v náustku. (viz *obrázek 16*) (Fink and Stapleton 2022).

Ultrazvukové nebulizátory mají podobně jako tryskové velký zbytkový objem, ale jak již bylo napsáno v rešeršní části, nejsou vhodným typem inhalátoru pro fagoterapii. Mřížkové nebulizátory na rozdíl od tryskových znebulizují téměř celý roztok, který do nich naplníme. Zůstane v nich méně než 10 % roztoku a tím se stávají někdy i třikrát účinnější než tryskové a ultrazvukové nebulizátory (Fink and Stapleton 2022).

Stabilita tohoto lipozomového systému byla již dříve zkoumána a bylo zjištěno, že nebulizace stabilitu zásadně neovlivnila a nezměnila ani velikostní distribuci lipozomových vezikul. O stabilitě tohoto lipozomového systému nebulizovaného inhalátorem Aerogen Solo je napsán článek (Szabova et al. 2021). Lze tedy předpokládat, že by nebulizaci přežili i fágové uvnitř vezikul.

V třetí části experimentu byla zjišťována stabilita fágových lyzátů po nebulizaci jednotlivými typy nebulizátorů. Nebulizátory mají tu výhodu, že mohou dodávat fágový lyzát bez dalšího zpracování. Což by bylo nutné u pMDI a DPI (Carrigy, Chang, Leung, Harrison, Petrova, Pope, Hatfull, Britton, Chan, Sauvageau, Finlay and Vehring 2017). Nejméně lyzáty degradoval InnoSpire® Elegance, nebulizace způsobila zmenšení titru z původních  $4,97E+10$  PFU/ml na  $2,53E+10$  PFU/ml. Naopak nejvíce fágové lyzáty zdegradovaly při použití Pari® LC Sprint (na  $8,67E+9$  PFU/ml), výsledek je tedy o řád nižší než původní fágový lyzát. Při porovnání se studií (Astudillo, Leung, Kutter, Morales and Chan 2018), kde byl nebulizován jiný druh fága lze říci, že pokud je inhalací dodána dávka v řádech  $10^8$ - $10^9$  PFU/ml, tak je fagoterapie účinná. Tedy lze říci, že inhalace fágových lyzátů (použitých v experimentu) vybranými nebulizátory by byla pro léčbu vhodná. Tento poznatek se shoduje s rešerší, kde bylo v kapitole 4.3.1.1 řečeno, že pro morfologicky stabilní fágy jsou jak mřížkové, tak tryskové nebulizátory vhodnou volbou k léčbě.

## 8 Závěr

Rešerše ukázala, že pro fagoterapii je zatím nejvíce prozkoumaná inhalace pomocí nebulizátorů. Přičemž nejvhodnějšími zařízeními jsou tryskové a mřížkové nebulizátory. Ultrazvukové nebulizátory degradují léky citlivé na teplo. Lipozomy jsou termosenzitivní a někteří fágové také, z tohoto důvodu ultrazvukové nebulizátory nejsou vhodnou volbou.

Po provedení rešerše byla experimentálně prozkoumána nebulizace lipozomů a fágových lyzátů. Obě tyto lékové formy by mohly být použity pro fagoterapii, přičemž lipozomy jsou vnímány jako vezikuly pro bakteriofágy.

Protože již bylo ověřeno, že stabilita lipozomálního systému (který byl v experimentální části použit) není výrazně ovlivněna nebulizací, v experimentální části se pouze zjišťovaly velikostní distribuce aerosolu a usazení aerosolu v zjednodušeném modelu plic. Měření velikostní distribuce ukázala, že PARI® LC Sprint Star vyprodukuje větší množství FPF než Aerogen® Solo, z toho vyplývá, že by se do plic dostalo větší množství léku. Na druhou stranu Aerogen je mřížkovým nebulizátorem a tyto nebulizátory mají mnohem menší zbytkový objem než tryskové nebulizátory. Tedy není vyloučeno, že by se do plic dostalo stejné množství léku při porovnání obou přístrojů. Nebulizace lipozomálního systému do modelu plic ukázala, že největší část znebulizovaného léku se dostane do plic. Nicméně by bylo vhodné výrazně snížit množství aerosolu v náustku.

Při experimentu s fágovými lyzáty bylo ověřeno, že tryskové a mřížkové nebulizátory použitý fágový lyzát nedegradovaly tak, že by po nebulizaci nebyl schopen infekce. Ze tří použitých nebulizátorů se nejvhodnějším nebulizátorem ukázal InnoSpire® Elegance. Které z těchto tří zařízení je pro fágový lyzát nejvhodnější více ukáže měření velikostní distribuce aerosolu.

Bylo by vhodné více se zaměřit na fagoterapii s použitím inhalátorů MDI, SMI a DPI. Tato zařízení jsou pro běžné uživatele sympatičtější svojí skladností. Ovšem v případě DPI je příprava suché formy léku náročnější, je tedy pochopitelné, že se studie více ubírají směrem kapalně formy léku.

## Seznam použitých zdrojů

- ARI, A. Jet, Ultrasonic, and Mesh Nebulizers: An Evaluation of Nebulizers for Better Clinical Outcomes. *Eurasian Journal of Pulmonology*, Apr 2014, 16(1), 1-7.
- ASTUDILLO, A., S. S. Y. LEUNG, E. KUTTER, S. MORALES, et al. Nebulization effects on structural stability of bacteriophage PEV 44. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Apr 2018, 125, 124-130.
- BISGAARD, H., C. O'CALLAGHAN AND G. C. SMALDONE *Drug Delivery to the Lung*. Edition ed. New York: Marcel Dekker, 2001. ISBN 0-8247-0541-6.
- CARRIGY, N. B., R. Y. CHANG, S. S. Y. LEUNG, M. HARRISON, et al. Anti-Tuberculosis Bacteriophage D29 Delivery with a Vibrating Mesh Nebulizer, Jet Nebulizer, and Soft Mist Inhaler. *Pharmaceutical Research*, Oct 2017, 34(10), 2084-2096.
- CHANG, R. Y. K., M. WALLIN, E. KUTTER, S. MORALES, et al. Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, Apr 2019, 560, 11-18.
- CHANG, R. Y. K., M. WALLIN, Y. LIN, S. S. Y. LEUNG, et al. Phage therapy for respiratory infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Aug 2018, 133, 76-86.
- CHRYSTYN, H. The Diskus (TM): a review of its position among dry powder inhaler devices. *International Journal of Clinical Practice*, Jun 2007, 61(6), 1022-1036.
- DAL NEGRO, R. W. Dry powder inhalers and the right things to remember: a concept review. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 2015, 10.
- DALBY, R., M. SPALLEK AND T. VOSHAAR A review of the development of RespiMat((R)) Soft Mist (TM) Inhaler. *International Journal of Pharmaceutics*, Sep 2004, 283(1-2), 1-9.
- DALBY, R. AND J. SUMAN Inhalation therapy: technological milestones in asthma treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Jul 2003, 55(7), 779-791.
- DALBY, R. N., J. EICHER AND B. ZIERENBERG Development of RespiMat((R)) Soft Mist (TM) Inhaler and its clinical utility in respiratory disorders. *Medical Devices-Evidence and Research*, 2011, 4, 145-155.
- DARQUENNE, C. Deposition of aerosols in the lung: Deposition mechanisms. In *The Textbook of Aerosol Medicine*. The International Society for Aerosols in Medicine, 2022.
- DE BOER, A. H., P. HAGEDOORN, M. HOPPENTOCHT, F. BUTTINI, et al. Dry powder inhalation: past, present and future. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Apr 2017, 14(4), 499-512.
- DEKHUIJZEN, P. N. R., F. LAVERINI AND O. S. USMANI Patients' perspectives and preferences in the choice of inhalers: the case for RespiMat (R) or HandiHaler (R). *Patient Preference and Adherence*, 2016, 10, 1561-1572.
- DEVADASON, S. Drug delivery devices: Spacers and valved holding chambers. In *The Textbook of Aerosol Medicine*. The International Society for Aerosols in Medicine, 2022.
- DOSS, J., K. CULBERTSON, D. HAHN, J. CAMACHO, et al. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses-Basel*, Mar 2017, 9(3).
- FARR, R., D. S. CHOI AND S. W. LEE Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, Apr 2014, 10(4), 1741-1750.
- FINK, J. B. AND K. W. STAPLETON. Drug delivery devices: Nebulizers. In *The Textbook of Aerosol Medicine*. The International Society for Aerosols in Medicine, 2022.
- FINLAY, W. H. *The Mechanics of Inhaled Pharmaceutical Aerosols. An Introduction*. Edition ed. San Diego: Academic press, 2001.
- GRIM, M. AND R. DRUGA *Základy anatomie. 3. Trávicí, dýchací, močopohlavní a endokrinní systém*. Edition ed. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-302-8.

- HICKEY, A. J. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*. Edition ed. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 0-8247-4253-2.
- HOE, S., M. A. BORAIEY, J. W. IVEY, W. H. FINLAY, et al. Manufacturing and Device Options for the Delivery of Biotherapeutics. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, Oct 2014, 27(5), 315-328.
- IBRAHIM, M., R. VERMA AND L. GARCIA-CONTRERAS Inhalation drug delivery devices: technology update. *Medical Devices-Evidence and Research*, 2015, 8, 131-139.
- ISLAM, N. AND E. GLADKI Dry powder inhalers (DPIs) - A review of device reliability and innovation. *International Journal of Pharmaceutics*, Aug 2008, 360(1-2), 1-11.
- IWANAGA, T., Y. TOHDA, S. NAKAMURA AND Y. SUGA The Respimat (R) Soft Mist Inhaler: Implications of Drug Delivery Characteristics for Patients. *Clinical Drug Investigation*, Nov 2019, 39(11), 1021-1030.
- KAUR, S., A. KUMARI, A. K. NEGI, V. GALAV, et al. Nanotechnology Based Approaches in Phage Therapy: Overcoming the Pharmacological Barriers. *Frontiers in Pharmacology*, Oct 2021, 12.
- KLABAN, V. *Ekologie mikroorganismů. Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. Edition ed.: Galén, 2011. ISBN 978-80-7276-770-7.
- LEUNG, S. S. Y., N. B. CARRIGY, R. VEHRING, W. H. FINLAY, et al. Jet nebulization of bacteriophages with different tail morphologies - Structural effects. *International Journal of Pharmaceutics*, Jan 2019, 554, 322-326.
- LOH, B., V. S. GONDIL, P. MANOHAR, F. M. KHAN, et al. Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar 2021, 87(5).
- MEHTA, P. P., D. GHOSHAL, A. P. PAWAR, S. S. KADAM, et al. Recent advances in inhalable liposomes for treatment of pulmonary diseases: Concept to clinical stance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Apr 2020, 56.
- NEWMAN, S. P. Drug delivery devices: Pressurized Metered Dose Inhalers. In *The Textbook of Aerosol Medicine*. The International Society for Aerosols in Medicine, 2022a.
- NEWMAN, S. P. Fine particle fraction: The good and the bad. In *The Textbook of Aerosol Medicine*. The International Society for Aerosols in Medicine, 2022b.
- NEWMAN, S. P. AND W. W. BUSSE Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance. *Respiratory Medicine*, May 2002, 96(5), 293-304.
- NIKANDER, K., C. NICHOLLS, J. DENYER AND J. PRITCHARD The Evolution of Spacers and Valved Holding Chambers. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, Aug 2014, 27, S4-S23.
- O'CALLAGHAN, C. AND P. W. BARRY The science of nebulised drug delivery. *Thorax*, Apr 1997, 52, S31-S44.
- PARI. PARI LC SPRINT Nebuliser. In.: PARI GmbH, 2022.
- PEDERSEN, S. Inhalers and nebulizers: Which to choose and why. *Respiratory Medicine*, Feb 1996, 90(2), 69-77.
- POLYMED®. Mikronebulizátor Aerogen Solo. In.: POLYMED®, 2022.
- PONKSHE, P., S. FENG AND C. L. TAN Inhalable liposomes for treating lung diseases: clinical development and challenges. *Biomedical Materials*, Sep 2021, 16(5).
- ROSYPAL, S. *Bakteriologie a virologie*. Edition ed. Praha: Scientia, spol s. r. o., 1994. ISBN 80-85827-16-6.
- RUDOKAS, M., M. NAJLAH, M. A. ALHNAN AND A. ELHISSI Liposome Delivery Systems for Inhalation: A Critical Review Highlighting Formulation Issues and Anticancer Applications. *Medical Principles and Practice*, 2016, 25, 60-72.
- SANDERS, M. AND R. BRUIN A Rationale for Going Back to the Future: Use of Disposable Spacers for Pressurised Metered Dose Inhalers. *Pulmonary Medicine*, 2015, 2015.

- SMITH, I. J. AND M. PARRY-BILLINGS The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 16(2), 79-95.
- STEIN, S. W. AND C. G. THIEL The History of Therapeutic Aerosols: A Chronological Review. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, Feb 2017, 30(1), 20-41.
- SZABOVA, J., O. MISIK, M. HAVLIKOVA, F. LIZAL, et al. Influence of liposomes composition on their stability during the nebulization process by vibrating mesh nebulizer. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, Aug 2021, 204.
- TIMSINA, M. P., G. P. MARTIN, C. MARRIOTT, D. GANDERTON, et al. DRUG-DELIVERY TO THE RESPIRATORY-TRACT USING DRY POWDER INHALERS. *International Journal of Pharmaceutics*, Jan 1994, 101(1-2), 1-13.
- TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. Edtion ed. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- TURGEON, N., M. J. TOULOUSE, B. MARTEL, S. MOINEAU, et al. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, Jul 2014, 80(14), 4242-4250.
- WANG, X., Z. Z. XIE, J. H. ZHAO, Z. H. ZHU, et al. Prospects of Inhaled Phage Therapy for Combatting Pulmonary Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Dec 2021, 11.
- ZHANG, Y. J., M. SOTO, D. GHOSH AND R. O. WILLIAMS Manufacturing Stable Bacteriophage Powders by Including Buffer System in Formulations and Using Thin Film Freeze-drying Technology. *Pharmaceutical Research*, Oct 2021, 38(10), 1793-1804.
- ZHOU, Q., P. TANG, S. S. Y. LEUNG, J. G. Y. CHAN, et al. Emerging inhalation aerosol devices and strategies: Where are we headed? *Advanced Drug Delivery Reviews*, Aug 2014, 75, 3-17.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Edtion ed. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.

## Seznam použitých symbolů

Symbol	Rozměr	Veličina
$d$	[m]	průměr dýchacích cest
$d_p$	[m]	průměr částice
$D_{16}$	[m]	aerodynamický průměr
$FPF$	[%]	fine particle fraction
$g$	[m·s <sup>-2</sup> ]	gravitační zrychlení
$GSD$	[μm]	geometrická standardní odchylka
$MMAD$	[μm]	medián hmotnostního rozložení částic aerosolu
$Stk$	[-]	stokesovo číslo
$u$	[m·s <sup>-1</sup> ]	střední rychlost částice
$v_s$	[m·s <sup>-1</sup> ]	sedimentační rychlost
$\rho_p$	[kg·m <sup>-3</sup> ]	hustota částice
$\mu$	[-]	dynamická viskozita

## **Seznam použitých zkratek**

<b>Zkratka</b>	<b>Význam</b>
AAD	technologie adaptivního dodávání aerosolu
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
DPI	inhalátor pro práškovou formu léku
IPA	inhalační farmaceutické aerosoly
pMDI	aerosolové dávkovače
SFD	spray freeze drying
SD	sušení rozprašováním
SMI	soft mist inhalátor
TFFD	thin film freeze drying
VHC	komora s jednocestným ventilem
WHO	světová zdravotnická organizace

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Hrubá struktura dýchacího systému. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Bisgaard, O'Callaghan and Smaldone 2001).....	15
Obrázek 2: Mechanismy ukládání inhalovaných částic v dýchacím systému. Místa uložení jednotlivými mechanismy jsou ilustrativní, mohou se také vyskytovat v jiných místech. Obrázek byl převzatý a upravený ze zdroje (Darquenne 2022).....	17
Obrázek 3: Schéma principu funkce přepážek u nebulizátoru. Převzato a upraveno ze zdroje (Fink and Stapleton 2022).....	19
Obrázek 4: Konvenční pMDI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Newman 2022a).....	20
Obrázek 5: pMDI se spacerem, ventilem a obličejovou maskou. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Sanders and Bruin 2015).....	21
Obrázek 6: Schéma konvenčních DPI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Ibrahim, Verma and Garcia-Contreras 2015).....	23
Obrázek 7: Schéma Diskusu. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Chrystyn 2007).....	23
Obrázek 8: Schéma SMI. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Iwanaga, Tohda, Nakamura and Suga 2019).....	24
Obrázek 9: Schéma ultrazvukového nebulizátoru. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Fink and Stapleton 2022).....	26
Obrázek 10: Struktura a tvar bakteriofága T4. Obrázek je převzatý ze zdroje (Rosypal 1994).....	27
Obrázek 11: Lytický cyklus fágů. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Klaban 2011)....	28
Obrázek 12: Lipozomy sloužící jako vezikuly pro bakteriofágy: Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Loh, Gondil, Manohar, Khan, Yang and Leptihn 2021).....	32
Obrázek 13: Zleva Pari LC Sprint Star a Aerogen Solo. Obrázky jsou převzaty ze zdrojů (PARI 2022; POLYMED® 2022).....	34
Obrázek 14: Schéma zapojení při měření, autor: Ing. Ondřej Mišík.....	35
Obrázek 15: Foto trati při použití tryskových nebulizátorů (na tomto foto Pari LC Sprint Star).....	36
Obrázek 16: Foto zachycování znebulizovaného roztoku mřížkovým nebulizátorem.....	37
Obrázek 17: Kumulativní distribuce aerosolů.....	38

Obrázek 18: Maloobjemový tryskový nebulizátor – kolik procent roztoku pacient inhaluje. Nominální dávka udává objem roztoku v nebulizátoru před nebulizací. Emitovaná dávka udává rozdíl nominální dávky a zbytkového objemu. Inhalovatelná dávka udává emitovanou dávku vynásobenou podílem času nádechu ku času dýchacího cyklu. Vdechnutelná dávka udává vdechnutou hmotnost vynásobenou procenty, které tvoří FPF. Obrázek je převzatý a upravený ze zdroje (Fink and Stapleton 2022).....40

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1: Okolní podmínky v laboratoři.....	35
Tabulka 2: Okolní podmínky v laboratoři.....	37
Tabulka 3: Výsledky měření na APS.....	38
Tabulka 4 : Výsledky měření na modelu plic.....	38
Tabulka 5: Výsledky titrace fágových lyzátů.....	39