

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY
KATEDRA BIOCHEMIE



**BIOCHEMICKÉ ASPEKTY VYUŽITÍ
NANOMATERIÁLŮ V BIOMEDICÍNSKÝCH
APLIKACÍCH**

HABILITAČNÍ PRÁCE

Brno 2020

Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

OBSAH

ÚVOD	6
Biochemické aspekty využití nanomateriálů v biomedicínských aplikacích (komentář k souboru publikací)	
BLOK I – BIONANOMATERIÁLY	39
I-1 KAPITOLA.....	40
Heger Z., Skaličková S., Zítka O., Adam V., Kizek R.: Apoferritin Applications in Nanomedicine, <i>Nanomedicine</i> . 2014 , 9, 2233-2245. IF ₂₀₁₄ 5,413.	
I-2 KAPITOLA.....	54
Dostálová S., Vašíčková K., Hynek D., Křížková S., Richtera L., Vaculovičová M., Eckschlager T., Stiborová M., Heger Z., Adam V. Apoferritin as an Ubiquitous Nanocarrier with Excellent Shelf Life, <i>Int. J. Nanomed.</i> 2017 , 12, 2265-2278. IF ₂₀₁₇ 4,370.	
I-3 KAPITOLA.....	69
Indra R., Černá T., Heger Z., Hraběta J., Wilhelm M., Dostálová S., Lengálová A., Martínková M., Adam V., Eckschlager T., Schmeiser H. H., Arlt V. M., Stiborová M. Ellipticine-Loaded Apoferritin Nanocarrier Retains DNA Adduct-Based Cytochrome P450-Facilitated Toxicity in Neuroblastoma Cells, <i>Toxicology</i> . 2019 , 419, 40-54. IF ₂₀₁₈ 3,547.	
I-4 KAPITOLA.....	86
Pekařík V., Pešková M., Guráň R., Nováček J., Heger Z., Tripsianes K., Kumar J., Adam V. Visualization of Stable Ferritin Complexes with Palladium, Rhodium and Iridium Nanoparticles Detected by their Catalytic Activity in Native Polyacrylamide Gels, <i>Dalton Trans.</i> 2017 , 46(40), 13690-13694. IF ₂₀₁₇ 4,099.	
I-5 KAPITOLA.....	92
Pešková M., Ilkovic L., Hynek D., Dostálová S., Sanchez-Carnerero E. M., Remeš M., Heger Z., Pekařík V. Detergent-Modified Catalytic and Enzymomimetic Activity of Silver and Palladium Nanoparticles Biotemplated by <i>Pyrococcus Furiosus</i> Ferritin, <i>J. Colloid. Interface Sci.</i> 2019 , 537, 20-27. IF ₂₀₁₈ 6,361.	
I-6 KAPITOLA.....	101
Tesařová B., Charousová M., Dostálová S., Bienko A., Kopel P., Kruszynski R., Hynek D., Michálek P., Eckschlager T., Stiborová M., Adam V., Heger Z. Folic Acid-Mediated Re-Shuttling of Ferritin Receptor Specificity Towards a Selective Delivery of Highly Cytotoxic Nickel(II) Coordination Compounds, <i>Int. J. Biol. Macromolecules</i> . 2019 , 126, 1099-1111. IF ₂₀₁₈ 4,784.	
I-7 KAPITOLA.....	115
Dostálová S., Černá T., Hynek D., Koudelková Z., Vaculovič T., Kopel P., Hraběta J., Heger Z., Vaculovičová M., Eckschlager T., Stiborová M., Adam V. Site-Directed Conjugation of	

Antibodies to Apoferritin Nanocarrier for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer Cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2016**, 8(23), 14430-14441. IF₂₀₁₆ 7,504.

I-8 KAPITOLA..... 128

Haddad Y., Charousová M., Životská H., Šplíchal Z., Merlos Rodrigo M. A., Michálková H., Křížková S., Tesařová B., Richtera L., Vítek P., Stokowa-Soltys K., Hynek D., Milosavljevic V., Dostálová S., Heger Z. Biomimetic Norepinephrine Transporter-Homing Peptides Enable Rapid Endocytosis of Drug Delivery Nanovehicles into Neuroblastoma Cells, *J. Nanobiotechnol.* **2020**, under review. IF₂₀₁₈ 5,345.

I-9 KAPITOLA..... 172

Dostálová S., Polanská H., Svobodová M., Balvan J., Kryštofová O., Haddad Y., Křížková S., Masařík M., Eckschlager T., Stiborová M., Heger Z., Adam V. Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Site-Directed Antibody-Conjugated Apoferritin Nanovehicle Favorably Influences *in Vivo* Side Effects of Doxorubicin, *Sci. Rep.* **2018**, 8, Art. no. 8867. IF₂₀₁₈ 4,011.

I-10 KAPITOLA..... 186

Tesařová B., Dostálová S., Šmídová V., Goliášová Z., Škubalová Z., Michálková H., Hynek D., Michálek P., Polanská H., Vaculovičová M., Háček J., Eckschlager T., Stiborová M., Pires A. S., Neves A. R. M., Abrantes A. M., Rodrigues T., Matafome P., Botelho M. F., Teixeira P., Mendes F., Heger Z. Surface-PASylation of Ferritin to Form Stealth Nanovehicles Enhances *in Vivo* Therapeutic Performance of Encapsulated Ellipticine, *Appl. Mater. Today*. **2019**, in press. IF₂₀₁₈ 8,013.

I-11 KAPITOLA..... 198

Milosavljevic V., Jamrůz E., Gagic M., Haddad Y., Michálková H., Balková R., Tesařová B., Moulick A., Heger Z., Richtera L., Kopel P., Adam V. Encapsulation of Doxorubicin in Furcellaran/Chitosan Nanocapsules by Layer-by-Layer Technique for Selectively Controlled Drug Delivery, *Biomacromolecules*, 2019, in press. IF₂₀₁₈ 5,667.

I-12 KAPITOLA..... 216

Heger Z., Polanská H., Merlos Rodrigo M. A., Guráň R., Kulich P., Kopel P., Masařík M., Eckschlager T., Stiborová M., Kizek R., Adam V. Prostate Tumor Attenuation in the Nu/Nu Murine Model due to Anti-Sarcosine Antibodies in Folate-Targeted Liposomes, *Sci. Rep.* **2016**, 6, art. no. 33379. IF₂₀₁₆ 4,259.

BLOK II – ANORGANICKÉ MATERIÁLY A UHLÍKOVÉ ALOTROPY..... 228

II-1 KAPITOLA..... 229

Kudr J., Haddad Y., Richtera L., Heger Z., Černák M., Adam V., Zítka O. Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications, *Nanomaterials*. **2017**, 7(9), art. no. 243. IF₂₀₁₇ 3,504.

II-2 KAPITOLA..... 259

Michálková H., Strmiska V., Kudr J., Škubalová Z., Tesařová B., Švec P., Richtera L., Zítka O., Adam V., Heger Z. Tuning the Surface Coating of IONs Toward Efficient Sonochemical

Tethering and Sustained Liberation of Topoisomerase II Poisons, *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 7609-7624. IF₂₀₁₈ 4,471.

II-3 KAPITOLA..... 275

Buchtelová H., Strmiska V., Dostálová S., Michálek P., Křížková S., Kopel P., Hynek D., Richtera L., Adam V., Heger Z. pH-Responsive Hybrid Organic-Inorganic Ruthenium Nanoparticles for Controlled Release of Doxorubicin, *Part. Part. Syst. Char.* **2017**, *34*(11), art. no. 1700289. IF₂₀₁₇ 4,384.

II-4 KAPITOLA..... 285

Heger Z., Polanská H., Křížková S., Balvan J., Raudenská M., Dostálová S., Moulick A., Masařík M., Adam V. Co-Delivery of VP-16 and Bcl-2-Targeted Antisense on PEG-Grafted oMWCNTs for Synergistic *in Vitro* Anti-Cancer Effects in Non-Small and Small Cell Lung Cancer, *Colloid. Surf. B-Biointerfaces.* **2017**, *150*, 131-140. IF₂₀₁₇ 3,397.

II-5 KAPITOLA..... 296

Škubalová Z., Michálková H., Michálek P., Strmiska V., Guráň R., Merlos Rodrigo M. A., Částková K., Hynek D., Pekařík V., Zítka O., Adam V., Heger Z. Prevalent Anatase Crystalline Phase Increases the Cytotoxicity of Biphasic Titanium Dioxide Nanoparticles in Mammalian Cells, *Colloid. Surf. B-Biointerfaces.* **2019**, *182*, art. no. 110391. IF₂₀₁₈ 3,973.

II-6 KAPITOLA..... 307

Michálková H., Škubalová Z., Sopha H., Strmiska V., Tesařová B., Dostálová S., Švec P., Hromádka L., Motola M., Macák J. M., Adam V., Heger Z. Complex Cytotoxicity Mechanism of Bundles Formed from Self-Organised 1-D Anodic TiO₂ Nanotubes Layers in Human Epithelial Cells, *J. Hazard. Mater.* **2020**, *388*, art. no. 122054. IF₂₀₁₈ 7,650.

II-7 KAPITOLA..... 320

Buchtelová H., Strmiska V., Škubalová Z., Dostálová S., Michálek P., Křížková S., Hynek D., Kalina L., Richtera L., Moulick A., Adam V., Heger Z. Improving Cytocompatibility of CdTe Quantum Dots by Schiff-Base-Coordinated Lanthanides Surface Doping, *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, art. no. 43. IF₂₀₁₈ 5,345.

II-8 KAPITOLA..... 335

Moulick A., Heger Z., Milosavljevic V., Richtera L., Barroso-Flores J., Merlos Rodrigo M. A., Buchtelová H., Podgajny R., Hynek D., Kopel P., Adam V. Real-Time Visualization of Cell Membrane Damage Using Gadolinium-Schiff Base Complex-Doped Quantum Dots, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2018**, *10*(42), 35859-35868. IF₂₀₁₈ 8,456.

BLOK III – AUTONOMNÍ DYNAMICKÉ SYSTÉMY 346

III-1 KAPITOLA..... 347

Beladi-Mousavi S. M., Khezri B., Krejčová L., Heger Z., Sofer Z., Fisher A. C., Pumera M. Recoverable Bismuth-Based Microrobots: Capture, Transport, and On-Demand Release of Heavy Metals and an Anticancer Drug in Confined Spaces, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2019**, *11*(14), 13359-13369. IF₂₀₁₈ 8,456.

III-2 KAPITOLA..... 359

Khezri B., Beladi-Mousavi S. M., Krejčová L., Heger Z., Sofer Z., Pumera M. Ultrafast Electrochemical Trigger Drug Delivery Mechanism for Nanographene Micromachines, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, 29(4), art. no. 1806696. IF₂₀₁₈ 15,621.

III-3 KAPITOLA..... 370

Villa K., Krejčová L., Novotný F., Heger Z., Sofer Z., Pumera M. Cooperative Multifunctional Self-Propelled Paramagnetic Microrobots with Chemical Handles for Cell Manipulation and Drug Delivery, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, 28(43), art. no. 1804343. IF₂₀₁₈ 15,621.

ÚVOD

Biochemické aspekty využití nanomateriálů v biomedicínských aplikacích

(komentář k souboru publikací)

Významné vědecké objevy v oblasti fyziky, chemie a biologie, získané v průběhu uplynulých dvou dekád vyvolaly enormní zájem o výzkum v oblasti nanomateriálů a jejich využití v řadě oblastí, včetně biomedicíny. Nanomateriály již dnes ovlivňují každodenní život člověka, a to jak na úrovni běžně používaných technologií (televizory na bázi kvantových teček, funkční nátěry obsahující fotokatalytické nanomateriály), tak na úrovni péče o zdraví (antimikrobiální nanočástice ve „sprejích“ či oblečení nebo liposomální transportéry protinádorových léčiv). K dnešnímu dni prochází nepřeborné množství nanomateriálů různými fázemi klinických testů či validacemi jejich průmyslové využitelnosti a lze tak bezesporu očekávat, že jejich vliv na každodenní život bude neustále narůstat.

Předpona "nano" pochází z řeckého *nanos*, což v překladu znamená trpaslík. V řeči čísel označuje "nano" jednu miliardtinu (10^{-9}). Jeden nanometr (nm) je tedy jedna miliardtina (nebo také 0,000000001) metru. Obecně se dá říct, že jeden nanometr odpovídá šířce tří až pěti atomů a přibližně 80tisícině průměru lidského vlasu. Zajímavostí je, že nanotechnologie, konkrétně plasmonové nanočástice zlata a stříbra stojí za dichroickými vlastnostmi Lykurgova poháru (datován do 4. století našeho letopočtu). První zmínky o využití koloidního zlata pro léčbu či barvení keramiky pocházejí dokonce ze 4. až 5. století před naším letopočtem [Giljohann *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 3280/2010/].

První koncept moderních nanotechnologií nicméně definoval až profesor Richard Feynman ve své, dnes již legendární, přednášce z roku 1959 s názvem "*There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*" na půdě Kalifornského Technologického Institutu. Feynman již tehdy diskutoval možnosti přímé manipulace s atomární hmotou za účelem vytvoření nového paradigmatu syntetické chemie. Výraznější akceleraci výzkumu v oblasti nanotechnologií ale umožnil až objev řádkovacího tunelového

mikroskopu v roce 1981 [Nobelova cena za fyziku /1986/]. Tento neoptický mikroskop využívá jevu kvantového tunelování, přičemž dosahuje hloubkového rozlišení méně než 0,01 nm (10 pm). V roce 1989 pak tunelovací mikroskopie umožnila naplnění Feynmanovy teorie o manipulaci s atomy. Donald M. Eigler a Erhard K. Schweizer poprvé umístili 35 atomů xenonu na krystal niklu a vytvořili tak třípísmennou zkratku společnosti IBM [Eigler *et al. Nature* **344**, 524/1990/]. K dalšímu urychlení výzkumu nanotechnologií pak přispěl vývoj v oblasti elektronové mikroskopie, mikroskopie atomárních sil a klíčový objev fullerenu – nanoskopických alotropů uhlíku [Kroto *et al. Nature* **318**, 162/1985/; Nobelova cena za chemii /1996/].

K dnešnímu dni je známo nepřehledné množství nanomateriálů s ještě nepřehlednějším množstvím výjimečných vlastností. Ty jsou dány především velikostí, při které se začínají uplatňovat zákony kvantové fyziky (více než zákony klasické newtonovské mechaniky), obrovským specifickým povrchem, možností chemických modifikací povrchů těchto materiálů na míru požadovaným aplikacím a mnoha dalšími [Batista *et al. Science* **350**, 138/2015/].

V nejobecnějším pojetí se nanomateriály dělí na organické a anorganické. Do skupiny organických materiálů jsou řazeny liposomy, dendrimery, DNA origami či částice na bázi polymerů nebo proteinů. Skupina anorganických materiálů zahrnuje nanočástice kovů, kvantové tečky a také nanoformy uhlíkových alotropů (nanodiamanty, grafit, grafen, fullereny, uhlíkové nanotrubky). Obvyklé je také dělení dle morfologie, a to na 0-D materiály (sférické částice), 1-D materiály [vlákna, trubky, kdy je jeden rozměr (typicky délka) vyšší než nano] a 2-D materiály (grafen, germanen, fosforen a další, tvořící monoatomární vrstvy) [Babu *et al. Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 2960/2015/].

Bez nadsázky lze konstatovat, že se mnohé z těchto materiálů stávají součástí různých aspektů moderní medicíny. Mohou tak fungovat jako funkcionality přenosných diagnostických zařízení (biosenzorů), materiály pro jednoduchou a rychlou izolaci biomolekul pro genetická či

sérologická vyšetření, vysoce efektivní kontrastní látky pro diagnostické zobrazování, inteligentní biomateriálové implantáty, antimikrobiální alternativy antibiotik/fungicidů nebo jako systémy pro vazbu a transport biologicky aktivních látek [Wagner *et al. Nat. Biotechnol.* **24**, 1211/2006/]. Právě poslední zmíněná aplikace, tedy využití nanomateriálů pro vazbu a transport biologicky aktivních látek pro biomedicínské aplikace tvoří jednotící myšlenku předložené habilitační práce. Cílem tohoto procesu je specificky akumulovat léčivo v postižené tkáni při současném snížení kontaktu s necílovými buňkami. Vazbou léčiva s materiálovým nosičem lze také zvýšit jeho stabilitu či špatnou rozpustnost snižující výslednou biodostupnost. Díky tomu lze významně zvyšovat terapeutický index léčiv a následnou efektivitu terapie, což má mimo jiné důležitý socio-ekonomický dopad.

Obecný vědecký koncept cílené terapie byl definován profesorem Paulem Ehrlichem již v roce 1900. Prof. Ehrlich byl přesvědčen, že lze selektivně eliminovat patogeny bez toxického vlivu na zdravé tkáně hostitele hypotetickým terapeutikem, které pojmenovat "Zauberkegeln", tedy magické kulky (angl. magic bullets). Tato hypotéza vedla k vývoji Salvarsanu, prvního léčiva efektivního v terapii syfilitidy [Strebhardt *et al. Nat. Rev. Cancer* **8**, 473/2008/]. Další rozvoj výrazně sofistikovanějších "magických kulek" byl ale umožněn až díky detailnímu pochopení intra- a intercelulárních procesů, biochemie a biotechnologie, získanému v průběhu 20. století. V 60. letech 20. století došlo také k dramatickému rozvoji pochopení farmakokinetiky léčiv, což vedlo k definování tzv. zpožděného a kontrolovaného uvolňování terapeutik a vývoji prvních miniaturizovaných transportních systémů – koacervátových mikrokapsulí na bázi acetátu celulózy a ftalátu [Merkle *et al. J. Pharm. Sci.* **62**, 1444/1973/]. Tyto mikrokapsule se staly inspirací pro obrovské množství biodegradabilních materiálů schopných nejen kontrolovaně uvolňovat vázaná léčiva, ale i zvyšovat jejich biodostupnost. Tyto průlomové objevy vedly až k prvnímu nanoléčivu schválenému v roce 1995 pro terapii

karcinomu vaječníků a Kaposiho sarkomu – Doxil (hydrochlorid doxorubicinu enkapsulovaný v liposomálním obalu).

V rámci habilitační práce byly studovány jak organické bionanomateriály (**BLOK I**), tak anorganické nanomateriály, včetně některých alotropů uhlíku (**BLOK II**). V neposlední řadě byly také studovány pokročilé materiály schopné autonomního pohybu vlivem katalytické konverze exogenních substrátů, tzv. mikro- nebo nanoroboti (**BLOK III**). Důraz byl kladen především na pochopení chování výše zmíněných materiálů s cílem jejich využití pro cílenou terapii nádorových onemocnění, která jsou stále jedním z největších globálních zdravotnických problémů. Solidní nádory během své progresse stimulují okolní tkáň k procesu patologické angiogeneze. Na rozdíl od zdravých cév ale takto překotně vzniklé cévy vytváří defektní neovaskulaturu s velkými póry v endotelu [Morse *et al. Clin. Cancer Res.* **25**, 912/2019/]. Ačkoliv je tato vlastnost důležitá pro růst nádoru a tvorbu metastáz, defektní architekturu cév spolu s nedokonalou lymfatickou drenáží nádorové tkáně lze využít pro pasivní vstup a akumulaci nanočástic. Tento tzv. efekt zvýšeného průniku a zadržování (EPR z anglického Enhanced Permeation and Retention), poprvé popsáný v roce 1986 týmem profesora Hiroshiho Maedy [Matsumura *et al. Cancer Res.* **46**, 6387/1986/], je dodnes hlavním mechanismem vstupu většiny klinicky schválených transportérů. Studie nicméně ukazují, že pasivním transportem se do nádorové tkáně dostane pouze malé procento aplikovaných částic, a to především kvůli vysokému intersticiálnímu tlaku uvnitř nádoru.

Z toho důvodu se v posledních letech experimentálně čím dál více uplatňuje tzv. aktivní transport, využívající modifikaci transportérů ligandem (protilátky, vitamíny, peptidy, cukry, aptamery, atd.) s afinitou vůči strukturám specifickým pro nádorové buňky (receptory/transportéry) [Zhu *et al. Nano Today*, **18**, 65/2018/]. Ačkoliv lze aktivním cílením dosáhnout vysoké míry účinnosti, situace je často znesnadňována diferencíální expresí receptorů či transportérů napříč stejnými typy nádorových buněk. Aktivně cílené systémy jsou

navíc většinou vysoce sofistikované a multikomponentní, což vyžaduje detailní pochopení jejich osudu a efektu nejen na úrovni buněčné, ale i na úrovni celého organismu. To výrazně komplikuje schvalovací procesy napříč klinickým testováním.

Předkládaná habilitační práce, která je souborem 21 publikací s původními výsledky a 2 souhrnných odborných prací, ukazuje využitelnost celého spektra různých typů pasivně či aktivně cílených nanomateriálů pro biomedicínské aplikace. V **prvním bloku** se práce zaměřuje na bionanomateriály, konkrétně proteiny – feritiny, dále také liposomy a polysacharidy pro enkapsulaci bioaktivních molekul či katalyticky aktivních nanočástic. **Druhý blok** habilitační práce shrnuje dosažené poznatky týkající se využití anorganických nanomateriálů, a to nejen pro vazbu protinádorových léčiv, ale také pro jejich přímou selektivní cytotoxicitu ovlivněnou krystalovou strukturou a morfologií či pro specifickou vazbu s biomolekulami pro studium biochemických procesů. Ve **třetím bloku** jsou pak diskutované výsledky získané z testování autonomních systémů (mikro- nebo nanorobotů) schopných dynamického transportu terapeutik vlivem katalytické konverze exogenně přidávaného paliva. Ačkoliv je obor nanorobotiky pro cílený transport léčiv velmi mladý, již dnes se ukazuje, že může překonat některé překážky pasivně i aktivně cílených systémů. Prezentované výsledky představují důležité informace o enkapsulačních a vazebných postupech pro přípravu nanomateriálů pro biomedicínu, stabilitě výsledných struktur a celém spektru možností povrchových modifikací. Mezi tyto patří jak modifikace zvyšující biokompatibilitu, stabilitu, dobu cirkulace, efektivitu vazby a uvolňování terapeutik, tak modifikace ligandy pro aktivní cílení. V neposlední řadě byly připravené transportéry testovány za účelem potvrzení jejich funkčnosti a pochopení jejich mechanismů interakcí s buňkou a následným vlivem na biochemické a molekulární procesy, a to jak na úrovni *in vitro*, tak *in vivo*.

BLOK I – Bionanomateriály

Publikace zahrnuté do **prvního bloku** předložené habilitační práce se zaměřují na využití různých typů bionanomateriálů na bázi proteinů – feritinů, liposomů a polysacharidů pro cílenou protinádorovou léčbu. Prezentovány jsou především výsledky týkající se enkapsulací bioaktivních složek do struktur bionanomateriálů, povrchových modifikací, fyzikálně-chemických vlastností takto vzniklých struktur a také biologického efektu připravených bionanomateriálů, a to jak na úrovni *in vitro* a *in vivo*.

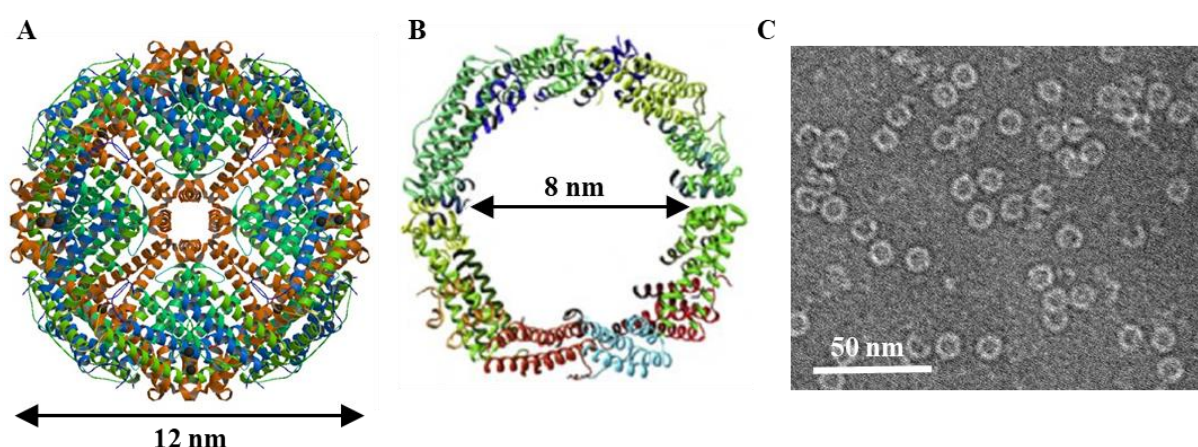
Díky svým výjimečným vlastnostem, jako je biokompatibilita a biodegradabilita jsou bionanomateriály v popředí zájmu biomedicínského výzkumu. Jak již bylo zmíněno výše, v nejobecnější rovině lze bionanomateriály klasifikovat na polymerní nanomateriály (micely, nanočástice, konjugáty s léčivý), dendrimery, DNA origami, liposomy a proteinové nosiče [Zhou *et al.* *Nanotech. Rev.* **6**, 473/2017/]. Oproti některým anorganickým materiálům, které mohou samy o sobě vykazovat protinádorové účinky, aniž by byly modifikovány léčivý, slouží bionanomateriály téměř výhradně jako nosiče terapeutik. Výjimku tvoří proteinové nanotransportéry. Ty lze využít nejen pro enkapsulaci či konjugaci léčiv, ale také pro přípravu molekulárních biomimetických nanostruktur, ve kterých je aktivní terapeutická část tvořena proteinem samotným.

První proteinové nanotransportéry se zaměřovaly na využití vlastností proteinů přirozeně cirkulujících v séru. To umožňuje stabilní, nicméně pasivní transport s relativně dlouhou dobou cirkulace v krevním řečišti a sníženou nežádoucí toxicitou. Za jeden z prvních úspěšných příkladů lze považovat Abraxane (schválen americkou Food and Drug Administration v roce 2005) tvořený paclitaxelem vázaným na albumin. Díky albuminovému nosiči vykazuje Abraxane proti volnému paclitaxelu nejen lepší farmakokinetiku, ale také protinádorové účinky. Po schválení Abraxanu vstoupila do klinických testů celá řada dalších konjugátů albuminu např. s docetaxelem, rapamycinem či inhibitory proteinů teplotního šoku [Bobo *et al.*

Pharm. Res. **33**, 2373/2016/]. Vzhledem k pasivitě procesu vstupu do nádorových buněk ale tyto systémy nevykazují dramatické zlepšení efektu vůči volným léčivům.

FERITINY

I z toho důvodu je snahou velkého množství vědeckých skupin, včetně té naší, využít sofistikovanějších bionanomateriálů pro řízené chování např. v mikroprostředí nádorů či intracelulárním prostředí buněk, ale také pro specifické interakce s nádorovými buňkami, tedy aktivní cílení. Jedním z velmi slibných proteinových kandidátů je i feritin, jemuž je věnována podstatná část prací uvedených v **bloku I**. Feritiny jsou oligomerní proteiny, které lze nalézt téměř ve všech živých organismech. Hlavní rolí feritinů je bránit nebezpečné akumulaci iontů železa v organismu jejich skladováním ve formě $[\text{FeOOH}]_8[\text{FeOPO}_3\text{H}_2]$ a jejich dalšího využití ve formě kofaktorů enzymů. Feritiny jsou značně stabilní, přičemž ani při inkubacích v teplotách přesahujících $70\text{ }^\circ\text{C}$ či vystavení prostředí s velmi širokým rozptylem pH od 3,0 do 10,0 nedochází k výraznému vlivu na jejich kvarterní strukturu. Jako oligomerní proteiny jsou savčí feritiny složeny ze 24 podjednotek (*H*- a *L*-, přirozeně se vyskytujících v různých poměrech). 24 podjednotek pak tvoří ~12 nm sférickou proteinovou klec s vnitřní kavitou o průměru ~8 nm (Obr. 1A-C).



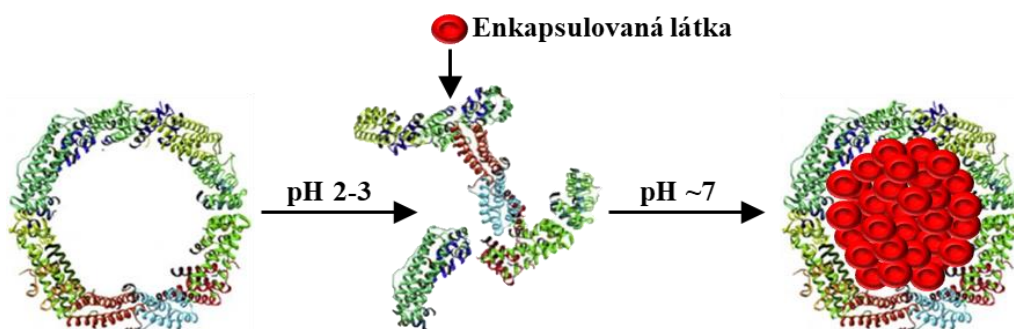
Obr. 1: (A) Krystalová struktura *H*-feritinu (*Homo sapiens sapiens*, PDB ID: 2FHA). (B)

Znázornění velikosti vnitřní kavity *H*-feritinu (*H. sapiens sapiens*). (C) Snímek

z transmisního elektronového mikroskopu (*H*-feritin, *H. sapiens sapiens* rekombinantně

produkovány v bakteriálním kmenu *Escherichia coli*, BL21(DE3)pLysS v rámci naší výzkumné skupiny).

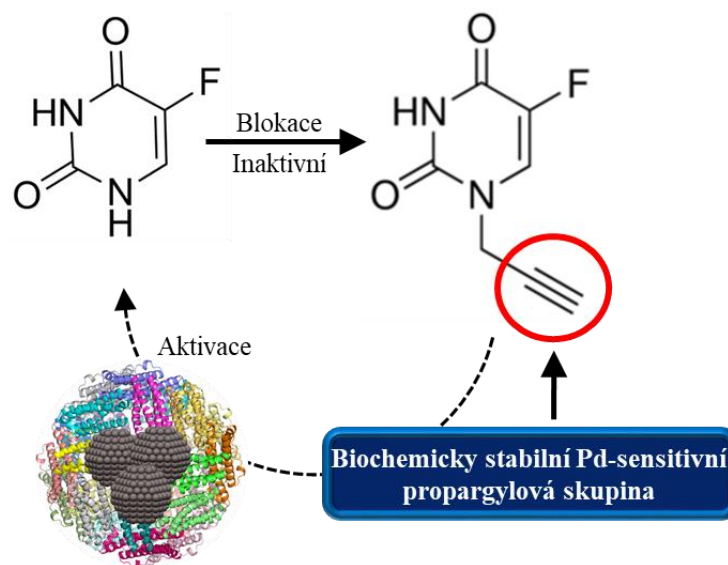
Výjimečnost feritinů tkví ve schopnosti reverzibilně disociovat na jednotlivé podjednotky vlivem snížení pH na hodnoty přibližně 2,5, přičemž zvýšení pH do neutrálních hodnot vede k „samosestavení“ do původní kvarterní struktury (Obr. 2). Tohoto jevu lze využít pro enkapsulaci téměř jakýchkoliv velikostně odpovídajících molekul do vnitřní kavity feritinů [publikace označené jako I-1, I-2, I-3, I-6, I-7, I-8, I-9 a I-10]. Takový enkapsulační protokol má několik nesporných výhod: *i*) výsledné nanočástice jsou značně homogenní, *ii*) vzhledem k uniformitě velikosti vnitřní kavity feritinů jsou enkapsulační protokoly reprodukovatelné a *iii*) enkapsulační protokol je velmi jednoduchý a nevyžaduje složité přístrojové vybavení. Díky stabilitě feritinů většinou dochází pouze k minimálnímu předčasnému uvolňování enkapsulovaných látek [I-2, I-3, I-7 a I-10]. Feritiny s enkapsulovanými bioaktivními látkami lze navíc bez problémů skladovat až několik měsíců bez tvorby aglomerátů či samovolného uvolňování enkapsulovaných molekul. Toto chování pak bylo úspěšně demonstrováno ve dvou pracích s inhibitory topoisomerasy II, doxorubicinem a elipticinem [I-2 a I-3].



Obr. 2: Schematické znázornění enkapsulačního protokolu založeného na reversibilní disociaci kvarterní struktury feritinu vlivem změn pH vnějšího prostředí.

Díky své proteinové povaze nabízí feritiny nejen nepřeberné množství cílených strukturních úprav pomocí molekulárního klonování, ale také možnost rekombinantní produkce těch

feritinů, jejichž přímá izolace z organismů by byla velmi složitá. V naší výzkumné skupině využíváme této technologie především pro produkci lidských feritinů s různými poměry podjednotek, delecemi či insercemi peptidových residuí pro ovlivnění přirozeného chování feritinů, ale také pro produkci feritinů derivovaných z extremofilních mikroorganismů, jako je např. hypertermofilní archea *Pyrococcus furiosus* [I-4 a I-5]. Zástupci tohoto druhu jsou známí pro schopnost růstu při teplotách okolo 100 °C, díky čemuž se u nich vyvinul unikátní metabolismus, produkující chemicky i fyzikálně velmi stabilní biomakromolekuly. Detailní analýzy odhalily, že ačkoliv je feritin *P. furiosus* strukturně i funkčně velmi podobný savčím feritinům, dokáže na rozdíl od nich v podmínkách *in vitro* beze změn funkčnosti vydržet několikadenní inkubaci při 100 °C [Tatur *et al. J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 615/2007/]. Těchto unikátních vlastností lze využít pro přípravu hybridních heterogenních katalyzátorů, kde feritin slouží jako bioreaktor nebo biotemplát pro syntézu katalyticky aktivních nanočástic na bázi přechodných kovů, které lze využít jako biokompatibilní katalytické jednotky pro štěpení allylových či propargylových skupin v bioortogonálních reakcích. Ty představují velmi progresivní směr cílené léčby, kdy je v nádorové tkáni akumulován katalyzátor, který je schopen *in situ* aktivovat biochemicky stabilní netoxická proléčiva na cytotoxické produkty (Obr. 3).



Obr. 3: Schematické znázornění principu bioortogonální aktivace proléčiva (5-fluoro-1-propargyl-uracil) heterogenním katalyzátorem na bázi feritinu s nanočásticemi ve vnitřní dutině. Po katalytické aktivaci vzniká cytotoxický 5-fluorouracil.

Naše výsledky ukazují, že rekombinantní feritin z *P. furiosus* je vhodným biotemplátem pro syntézu celého spektra nanočástic (Pd, Rh, Ir nebo Ag). Ty lze syntetizovat jak ve vnitřní kavitě, tak pevně imobilizované na povrchu feritinu. Tímto způsobem syntetizované nanomateriály byly s úspěchem testovány pro katalytické odbarvování nitrofenolu a azobarviv (methylová oranž, Kongo červeň), redukční dehalogenaci bor-dipyromethenu (konkrétně I.BODIPY), Suzuki-Miyaura cross-couplingovou reakci mezi I.BODIPY a fenyloboronovou kyselinou a také pro depropargylaci rhodaminu a 5-fluorouracilu. Tyto vyvinuté hybridní nanomateriály také vykazují výraznou peroxidasovou aktivitu [I-4 a I-5]. Na základě výše zmíněných katalytických aktivit byla pak námi vyvinuta jednoduchá metoda, která umožňuje studium interakcí protein-nanočástice ve standardním nativním polyakrylamidovém gelu a nevyžaduje žádnou robustní a finančně náročnou instrumentaci [I-4].

Přirozeně jsou feritiny v organismu internalizovány klathrinovou endocytózou. Zajímavostí je, že receptorová afinita je přímo spojená s typem podjednotek, které feritin tvoří. Obecně je tak známo, že feritiny bohaté na *H*-podjednotky vykazují afinitu vůči transferinovému receptoru

(TfR1), zatímco feritiny bohaté na *L*-podjednotky jsou internalizovány po interakci se SCARA5 (scavenger receptor class A member 5) [I-1]. U některých typů nádorových onemocnění dochází ke zvýšení exprese TfR1 či SCARA5 [Brookes *et al. Gut*, **55**, 1449/2006/ a Huang *et al. J. Clin. Investig.* **120**, 223/2010/]. I povrchově nemodifikované feritiny tak lze považovat za aktivně cílené nanotransportéry. Je ale nutné zmínit, že jak TfR1 tak SCARA5 jsou do značné míry exprimovány také některými zdravými tkáněmi (především játry, plícemi, lymfoidními tkáněmi či gastrointestinálním traktem), což má za následek nežádoucí akumulaci v necílových orgánech, především pak v játrech či srdci [I-9 a I-10]. Vzhledem k proteinové povaze lze ale feritin snadno povrchově modifikovat a výše zmíněnou receptorovou afinitu modulovat pro efektivnější cílení nádorových buněk [I-6, I-7, I-8, I-9 a I-10].

Jednou z možností je modifikovat povrch feritinů molekulami, které jsou schopné zvyšovat jejich stabilitu a dobu cirkulace feritinů v krevním řečišti. Tyto modifikace navíc dokážou eliminovat tvorbu proteinových korun na povrchu nanotransportérů a inhibovat tak opsonizaci a do určité míry také afinitu k přirozeným receptorům. Jednou z nejdéle využívaných a nejčastějších modifikací je tzv. PEGylace (modifikace polyethylenglykolem). Ačkoliv je PEGylace schválená u mnoha preparátů pro klinickou praxi (např. Doxil, Onivyde), vyznačuje se některými nevýhodami, jako je možné snížení biologické aktivity léčiv či nežádoucí vakuolizace bioaktivních látek a jejich následná sekvestrace v lysosomálním kompartmentu [Oh *et al. ACS Nano*, **5**, 6434/2011/]. Jednou ze slibných alternativ PEGylace je tzv. PASylace (modifikace povrchu krátkými, hydrofilními peptidy bohatými na prolin, alanin a serin). Tyto peptidy vykazují nižší viskozitu a vyšší hydrofilitu než PEG a jsou výrazně stabilní v krevní plasmě. V jedné z našich prací jsme provedli komparativní analýzu PEGylace a PASylace povrchu *L/H*-feritinu (*E. caballus*) s enkapsulovaným cytotoxickým alkaloidem elipticinem [I-10]. Všechny testované povrchové modifikace vykazovaly inhibici akumulace feritinu v makrofázích, snížení hemotoxicity enkapsulovaného elipticinu a také redukci tvorby

proteinových korun (adsorpci proteinů plasmy na povrch nanotransportérů). Nejlepších výsledků bylo dosaženo PASylací feritinů dekamerními PAS-peptidy (sekvence ASPAAPASC). Tou bylo možné téměř eliminovat tvorbu proteinových korun, přičemž byly feritiny ochotně internalizovány do intracelulárního prostoru buněk karcinomu prsu (MDA-MB-231), a to bez výrazné vakuolizace. Díky PASylaci povrchu feritinu bylo dosaženo selektivní bioakumulace elipticinu v myším xenograftu karcinomu prsu, přičemž nemodifikovaný feritin transportoval elipticin především do jater a srdeční svaloviny. Ačkoliv tedy PASylace neposkytuje vlastnosti aktivního cílení, takto modifikované feritiny zvyšují svoji biologickou stabilitu a dobu cirkulace, čímž dochází k jejich akumulaci v nádorové tkáni, pravděpodobně vlivem EPR efektu.

Povrchové modifikace peptidy jsou vhodné také pro aktivní cílení nanotransportérů [Valcourt *et al. Nano Res.* **11**, 4999/2018/]. Pro tyto účely lze využít tzv. biomimetické peptidy, tedy peptidy racionálně derivované na základě přirozených interakcí protein-protein či protein-peptid. V rámci našeho výzkumu se soustředíme na vývoj peptidů s vysokou afinitou k norepinefrinovému transportéru (NET), který je velmi často exprimován buňkami neuroblastomu (až 90 %) [Matthay *et al. Clin. Cancer Res.* **18**, 2740/2012/]. Na základě přirozené homo-dimerizace NET tak byla pomocí molekulového dokování a molekulové dynamiky virtuálně (*in silico*) navržena sada peptidů s vysokou afinitou k NET [**I-8**]. S využitím strukturních a výpočetních analýz byly následně vybrány dva kandidátní peptidy vykazující stabilní sekundární struktury a nízké energetické nároky pro vazbu s NET. Tyto peptidy byly imobilizovány na povrch feritinu s enkapsulovaným elipticinem. Série analýz *in vitro* potvrdila, že samotné peptidy nejsou cytotoxické a jsou schopny velmi efektivně interagovat s NET s následnou endocytózou feritinů s enkapsulovaným elipticinem do buněk neuroblastomu (SH-SY5Y). Navržené biomimetické peptidy tak představují slibné cílicí biomolekuly pro další preklinické testování.

Objev cisplatiny v 60. letech 20. století a její schválení pro klinickou praxi vedl k rozsáhlému výzkumu na poli biologicky aktivních koordinačních komplexů kovů. I přes řadu slibných výsledků dosažených s komplexy Ru, Au, Pt, Pd, Rh, Ni či Cu [Ndagi *et al. Drug. Des. Devel. Ther.* **11**, 599/2017/] se stále nepodařilo efektivně eliminovat jejich nežádoucí vedlejší účinky. Právě tyto vlastnosti řadí koordinační komplexy kovů mezi ideální kandidáty pro cílený transport pomocí bionanomateriálů. Vzhledem ke schopnosti Ni mimikovat nukleasovou aktivitu DNA-nukleasy jsme proto syntetizovali tři typy trinukleárních Ni koordinačních komplexů lišících se použitými ligandy [I-6]. Neenkapsulované komplexy vykazovaly vysokou cytotoxicitu a schopnost interkalovat do DNA s její následnou fragmentací. Z toho důvodu byl nejefektivnější komplex (Ni₂ s ligandem 1-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-*N*-(1*H*-benzimidazol-2-ylmethyl)methanaminem) dále enkapsulován do feritinu, jehož povrch byl modifikován kyselinou listovou přes *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidový linker pro aktivní cílení folátových receptorů (FR). FR jsou často zvýšeně exprimovány na buňkách solidních nádorů, přičemž jejich exprese ve zdravých tkáních je velmi nízká a omezená především na apikální povrch některých orgánů (ledviny, plíce či choroidní plexus) [Kelemen *et al. Int. J. Cancer*, **119**, 243/2006/]. Cílení FR pomocí konjugátů léčivo/nanočástice-kyselina listová je tak jedním z potentních přístupů cílené terapie. Naše výsledky ukazují, že feritin je schopen enkapsulovat dostatečné množství Ni₂ (>70 μM v 1 μM feritinu) a může být jednoduše modifikován kyselinou listovou (>190 μM v 1 μM feritinu). Získané nanostruktury byly schopny selektivně cílit buňky karcinomu prsu s vysokou expresí FR (T-47D) a dokonce významně zvyšovat akumulaci Ni₂ s následnou indukcí tvorby reaktivních forem kyslíku a apoptózy.

Monoklonální protilátky jsou pravděpodobně nejčastěji využívaným cílícím ligandem v aktivní nanomedicíně. Jejich nanomedicínské aplikace vycházejí především z úspěchu terapeutických protilátek a také konjugátů léčivo-protilátka (ADCs z anglického antibody-drug

conjugate), z nichž některé již byly schváleny pro klinickou praxi [Farahavar *et al. Biomater. Sci.* **7**, 4000/2019/]. Při povrchových modifikacích bionanomateriálů ale může být nevýhodou velikost protilátek a ochota nekontrolovaně interagovat s povrchem bionanomateriálů. To může vést až ke sterické blokaci paratopů protilátek a snížené schopnosti interakce s epitopy antigenů. S cílem eliminovat tuto častou komplikaci jsme vyvinuli konjugační systém pro prostorově řízenou imobilizaci protilátky na povrch feritinu [I-7]. Konjugační systém sestává z ultramalých nanočástic zlata adsorbovaných na povrchu feritinu, na které je afinitou zlatothiol vázán krátký syntetický peptid (HWRGWVC) odvozený od proteinu A (*Staphylococcus aureus*), který je schopný specificky vázat imunoglobuliny mezi jejich doménami CH2 a CH3 v regionu Fc [Deisenhofer, *Biochemistry*, **20**, 2361/1981/]. Posledním krokem je pak prostorově řízená imobilizace protilátky. Naše práce potvrdily robustnost a důležitost jednotlivých komponentů systémů pro správnou geometrii a návratnost vazby cílicí protilátky, a to jak v uměle vytvořených bezbuněčných podmínkách, tak v buněčné kultuře a preklinickém myším modelu *in vivo* [I-7 a I-9]. V obou případech byl jako modelové léčivo použit doxorubicin (Dox) a jako modelová protilátka vybrána myší monoklonální protilátka proti prostatickému specifickému membránovému antigenu (PSMA), který je hojně exprimován tkání karcinomu prostaty a často také endotelem nádorové neovaskulatury [O'Keefe *et al. Prostate*, **50**, 200/2004/]. V modelu ektopického karcinomu prostaty *in vivo* bylo zjištěno, že PSMA-cílený feritinový nanotransportér doxorubicinu vykazuje podobnou protinádorovou účinnost jako volný Dox, který ale na rozdíl od nanotransportéru způsoboval signifikantní ($p < 0.05$) snížení hmotnosti myší [I-9]. Analýzou orgánové akumulace Dox *ex vivo* bylo následně zjištěno, že Dox transportovaný pomocí PSMA-cíleného nanotransportéru byl preferenčně akumulován v nádorové tkáni, kdežto volné léčivo a nanotransportér bez protilátkové modifikace vykazovaly výraznou nežádoucí akumulaci také v srdeční svalovině a játrech. To vedlo ke zvýšení hladiny hodnot alkalické fosfatasy a aspartátové transaminasy, markerů poškození

myokardu a jaterních funkcí. Histologickými analýzami byla následně po aplikaci Dox a necíleného feritinu zjištěna vyšší míra vakuolizace kardiomyocytů, kongesce centrální jaterní žíly a nekróza jaterních buněk.

POLYSACHARIDY A LIPOSOMY

V naší výzkumné skupině se kromě bionanomateriálů na bázi feritinů zabýváme i liposomálními či polymerními nanotransportéry. Ty představují zajímavou biokompatibilní alternativu proteinů a nabízí mimo jiné možnost enkapsulace velkých molekul či enkapsulaci terapeutik i mezi jednotlivé vrstvy obalu nanotransportéru, což zvyšuje množství bioaktivní látky na jednu nanočástici. Právě tento mechanismus byl testován v naší studii enkapsulace Dox do nanočástic tvořených polysacharidy chitosanem a furcellaranem [I-11]. Ty představují přírodní polyelektrolyty, jejichž opačné náboje byly v naší práci využity pro přípravu vícevrstevných sférických nanočástic metodou LbL (z angl. Layer-by-Layer). Takto připravené nanočástice tvoří homogenní suspenzi schopnou stabilně vázat Dox po dobu několika týdnů a pozvolna jej kontrolovaně uvolňovat v hodnotách pH okolo 5.0, které odpovídá hodnotám pH organel endosomo-lysosomálního kompartmentu [Casey *et al. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **11**, 50/2010/]. Pro účely aktivního cílení byly polysacharidové nanočástice povrchově modifikovány cílícím peptidem (sekvence SMSIALR) s afinitou k CD31 a úspěšně testovány pro selektivitu jejich cytotoxicity *in vitro* na panelu tkáňových kultur. Zajímavostí je, že ačkoliv je s polymerními nosiči spojená problematika lysosomální vakuolizace s následnou indukcí syndromu lysosomálního strádání, nebyl pozorován vliv na lysosomální distribuci či jejich velikost. To je pravděpodobně dáno schopností polysacharidových nanočástic úplně se rozpustit vlivem lysosomálního pH s následným vyloučením Dox do intracelulárního prostoru.

Terapeutické protilátky jsou dnes běžně užívány nejen v protinádorové léčbě, ale také například v léčbě autoimunitních onemocnění [Elgundi *et al. Adv. Drug. Del. Rev.* **122**, 2/2017/]. Nevýhodou protilátek je ale jejich velikost a neschopnost běžných buněk protilátky

internalizovat do intracelulárního prostředí. Jejich využití je tak stále víceméně limitováno na interakci s extracelulárními doménami transmembránových proteinů. Tato limitace může být překonána pomocí bionanomateriálů, jak bylo demonstrováno v naší práci s liposomy s enkapsulovanými protilátkami proti sarkosinu [I-12], onkometabolitu důležitému pro rozvoj karcinomu prostaty [Sreekumar *et al. Nature*, **12**, 457/2009/]. Liposomy nesoucí protilátku, povrchově modifikované kyselinou listovou byly schopny inhibovat růst ektopického xenograftu karcinomu prostaty *in vivo*, stimulovat expresi genů řídících apoptózu a indukovat štěpení pro-caspasy 3 (pro-cysteine-aspartic protease 3) na exekutorovou caspasu 3. Ve studii bylo také zjištěno, že pokud je liposomálně transportován sarkosin, dochází k výrazné stimulaci růstu xenograftu a zvýšené expresi genů stimulujících proliferaci a buněčný cyklus. Publikovaná práce tak mimo jiné poskytla důležité doplňující informace o důležitosti sarkosinu pro růst buněk karcinomu prostaty.

SHRNUTÍ BLOKU I

Multidisciplinárním přístupem využívajícím metody biochemie, buněčné a molekulární biologie, organické, anorganické a analytické chemie k výzkumu v oblasti využití bionanomateriálů pro enkapsulaci a cílený transport biologicky aktivních látek bylo dosaženo celé řady výjimečných výsledků. Naše práce ukazují, že feritiny jsou nejen univerzálními nanotransportéry pro vysoce opakovatelnou enkapsulaci celého spektra bioaktivních látek, ale také, že vykazují vlastnosti, které jsou zásadní pro jejich použití v nanomedicíně. Mezi tyto vlastnosti patří především levná rekombinantní produkce vysoce homogenního materiálu, značná stabilita, vysoká enkapsulační kapacita a biokompatibilita. Feritiny tak mohou sloužit nejen pro přímý transport terapeutik do intracelulárního prostoru, ale také jako heterogenní katalyzátory schopné cílené bioakumulace pro následné bioortogonální reakce. Práce prezentované v **prvním bloku** habilitační práce také představují různé možnosti povrchových modifikací nejen pro zvýšení doby cirkulace v krevním řečišti, ale také pro vazbu cílících

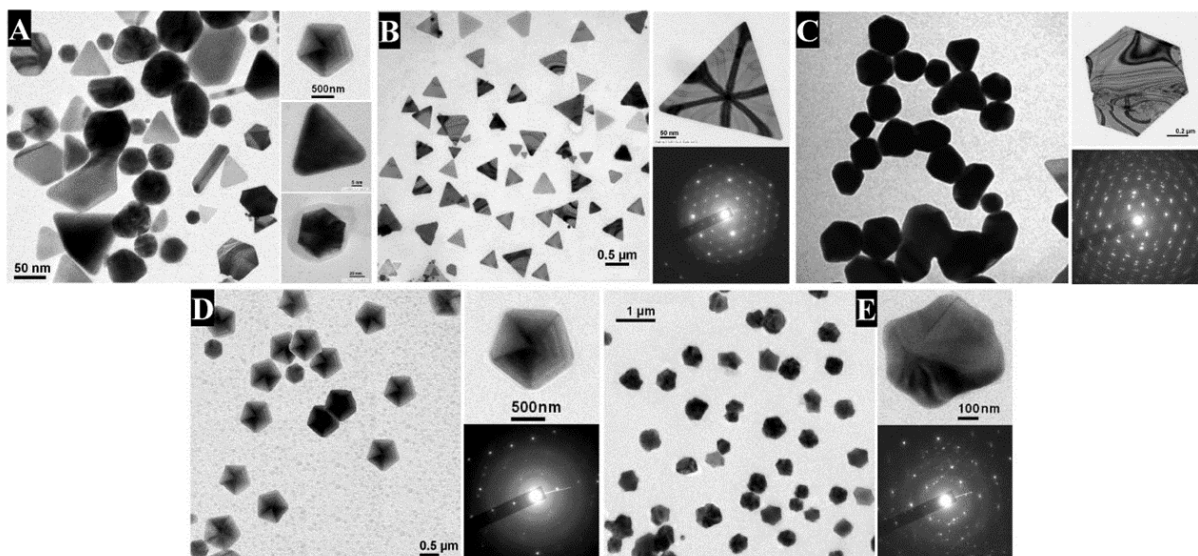
ligandů schopných inhibovat přirozenou receptorovou afinitu feritinů pro účely aktivního cílení. Pro tyto účely byly testovány nejen monoklonální protilátky, či vitamíny, ale také syntetické peptidy, z nichž některé byly vyvinuty v rámci našeho výzkumu a mohou sloužit jako unikátní podklad pro další vývoj vysoce selektivních terapeutik (pro modifikaci povrchu nanotransportérů nebo přípravu konjugátů peptid-léčivo). V neposlední řadě byly také úspěšně testovány bionanomateriálové alternativy feritinů, a to jak na bázi liposomů pro transport protilátek, které jsou příliš velké pro enkapsulaci do vnitřní kavity feritinu, tak na bázi polysacharidů připravených metodou LbL, která umožňuje enkapsulaci bioaktivních látek nejen do vnitřní kavity, ale také mezi jednotlivé polysacharidové vrstvy nanotransportéru.

Závěrem je nutné zmínit, že funkčnost některých typů bionanomateriálů a jejich povrchových modifikací byla úspěšně validována v preklinickém myším modelu (ektopické xenografty karcinomu prostaty či prsu). Připravené bionanomateriály vykazovaly schopnost zprostředkovat selektivní bioakumulaci a cytotoxicitu enkapsulovaných látek v nádorové tkáni. Histologickými a biochemickými analýzami bylo navíc zjištěno, že ani opakované aplikace nezpůsobovaly žádné pozorovatelné symptomy nežádoucí toxicity pro zdravé necílové tkáně. Náš budoucí výzkum v oblasti bionanomateriálů se tak zaměří především na návrh a rekombinantní produkci nových proteinových struktur a jejich racionální kombinaci s lipidovými či polymerními prvky schopnými inteligentního a predikovatelného chování v mikroprostředí nádoru.

BLOK II – Anorganické nanomateriály a uhlíkové alotropy

Publikace zahrnuté do **druhého bloku** habilitační práce se zabývají nanomateriály spadajícími do komplexní skupiny anorganických nanomateriálů a nanomateriály na bázi některých vybraných alotropů uhlíku. Předložené práce se zaměřují nejen na využití těchto materiálů pro povrchovou modifikaci a následnou imobilizaci pro transport a cílené uvolňování bioaktivních látek [**II-2, II-3 a II-4**], ale také na pochopení mechanismů cytotoxicity [**II-5 a II-6**]. Díky tomu lze v budoucnosti navrhovat materiály s vysokou biokompatibilitou či selektivní cytotoxicitou pro určitý typ buněk. V neposlední řadě jsou prezentovány práce zabývající se využitím polovodičových nanokrystalů – kvantových teček pro selektivní vizualizaci biochemických procesů, jako je poškození buněčných membrán či zvýšená exprese transmembránových proteinů [**II-7 a II-8**].

V kontrastu s bionanomateriály je výzkum v oblasti využití anorganických materiálů či uhlíkových alotropů v biomedicíně stále relativně mladým oborem. Rychlost rozvoje této oblasti výzkumu přímo koresponduje s pokroky ve vývoji metod syntézy, která dnes již umožňuje produkci vysoce homogenních preparátů. To je zásadní pro spolehlivost veškerých následných aplikací. Podmínkami syntézy lze pak také cíleně ovlivňovat velikost, morfologii materiálů či krystalovou strukturu (Obr. 4), a tudíž i výsledné chování [Kang *et al.* *ACS Nano*, **12**, 6997/2018/]. Anorganické materiály a uhlíkové alotropy vynikají snadnou povrchovou modifikací, často také vysokou stabilitou a nepřehlednou škálou dalších vlastností, které souvisejí s jejich fyzikálně-chemickou podstatou. Mezi těmito materiály lze pak najít kontrastní látky pro magnetickou resonanci, reportéry pro fluorescenční zobrazování či pozitronovou emisní tomografii, materiály sloužící pro cílený transport léčiv či (foto)termální ablační terapii a řadu dalších [Giner-Casares *et al.* *Mater. Today*, **19**, 19/2016/]. Mnoho z těchto materiálů je dnes komerčně dostupných a některé z nich jsou dokonce schváleny pro použití v humánní medicíně (Endorem, Lumirem, Resovist).



Obr. 4: Snímky z transmisního elektronového mikroskopu ukazující vliv změny v podmínkách syntézy na morfologii a krystalovou strukturu nanočástic zlata [převzato z Das *et al. Small*, **6**, 1012/2010/]. Použito se souhlasem nakladatele (John Wiley and Sons, číslo licence 4741291511518).

HYBRIDNÍ NANOMATERIÁLY

Jednu z nejúspěšnějších skupin nanomateriálů představují bezesporu materiály na bázi oxidů železa (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ty vynikají velmi nízkými výrobními náklady, vysokou stabilitou, biokompatibilitou a především magnetickým momentem, díky čemuž mohou vykazovat superparamagnetické chování, tzn., že jimi lze efektivně manipulovat vnějším magnetickým polem [II-1]. Výhodou je také jejich vysoká adsorpční kapacita, díky které lze na jejich povrch snadno imobilizovat organické (méně často anorganické) vrstvy pro zvýšení chemické afinity, doby cirkulace v krevním řečišti nebo také pro kontrolované uvolňování bioaktivních látek ve fyziologickém prostředí, jež často není s nemodifikovanými materiály možné. Takto vzniklé hybridní materiály (v angl. také core-shell) tak kombinují výhody anorganických částic s vlastnostmi bionanomateriálů, což z nich dělá unikátní biomedicínský nástroj. V naší práci se soustředíme především na povrchové modifikace

netoxickými polymery, polysacharidy nebo surfaktanty [II-2, II-3 a II-4]. V naší práci byly nanočástice železa využity jako model pro studium vlivu povrchové modifikace na vazbu a řízené uvolňování dvou inhibitorů topoisomerasy II (Dox a elipticinu) *in vitro*. Získané výsledky ukazují, že efektivitu adsorpce nejen povrchových modifikantů ale i inhibitorů topoisomerasy II lze výrazně zvýšit inkubací se současnou aplikací ultrazvuku. Ten generuje akustické kavitace a povrchové kolize, což vede k významnému zvýšení vazebného povrchu nanočástic. Získané hybridní nanomateriály byly schopny pH-responsivního uvolňování bioaktivních látek, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo s povrchovou modifikací polyvinylpyrrolidonem (PVP, pro hydrofilní Dox) a polyoxyethylen stearátem (POES, pro elipticin, který je ve vodě špatně rozpustný) [II-2]. Zajímavostí je, že ačkoliv samotné nanočástice nevykazovaly cytotoxicitu *in vitro*, byl zjištěn aditivní až synergický efekt na cytotoxicitu vázaných inhibitorů topoisomerasy II a také schopnost nanotransportérů inhibovat migraci buněk, způsobovat fragmentaci DNA a aktivovat exekutorovou caspasu-3. Podobných výsledků bylo dosaženo také s hybridními nanočásticemi na bázi ruthenia s kombinovanou povrchovou modifikací pomocí PVP a POES [II-3]. Kombinovaná modifikace vedla k výrazně vyšší pH-responsivitě uvolňování Dox než v případě předchozí studie. To bylo pravděpodobně způsobeno nižší mírou vazby mezi hydrazinovými skupinami PVP a ketonovými skupinami Dox vlivem převrstvení POES přes PVP. Zjištěn byl také výrazný synergický efekt nanočástic ruthenia na cytotoxicitu Dox *in vitro*, vysoká míra akumulace Dox v nádorových buňkách s následnou indukcí oxidačního stresu, kondensací chromatinu a signifikantně ($p < 0.05$) vyšší mírou indukované apoptózy (v porovnání s výsledky získanými po aplikaci volného Dox).

Nejen výše zmíněné práce ukazují, že anorganické nanočástice mohou sloužit jako platforma pro celé spektrum povrchových modifikací za účelem kontrolované imobilizace bioaktivních látek a mohou také přispívat ke zvýšení jejich cytotoxicity [Wang *et al. Int. J. Nanomed.* **14**, 7665/2019/, II-2 a II-3]. Nanomateriály mohou sloužit i jako nosiče pro tzv.

duální transport, tedy současnou dopravu dvou biologicky aktivních látek. Duální transport je velmi často skloňován v souvislosti s chemoresistentním fenotypem nádorových buněk. Jeho cílem je internalizovat látky, které vykazují synergický cytotoxický efekt, nebo je jedna z nich schopna deregulovat molekulární kaskády zodpovědné za chemoresistenci a nepřímo tak stimulovat cytotoxicitu té druhé [Valencia *et al. Nanomed.* **8**, 687/2013/]. Pro účely deregulace molekulárních kaskád jsou velmi často používány malé nekódující RNA nebo antisens-oligonukleotidy (ASOs). Ty jsou schopny buď inhibovat expresi proteinů hybridizací s kódující mRNA a tvorbou heteroduplexu mRNA/ASO s následnou sterickou blokáží vstupu do A-místa ribozomu nebo přímo štěpit mRNA po hybridizaci malých nekódujících RNA vázaných v proteinovém komplexu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). V naší práci jsme se zaměřili na duální transport ASOs navržených pro inhibici exprese antiapoptického proteinu Bcl-2 (vazbou prvních šesti kodonů mRNA kódující Bcl-2) a etoposidu [II-4]. Bcl-2 je často zodpovědný za chemoresistenci nádorových onemocnění [Bhola *et al. J. Clin. Invest.* **126**, 3827/2016] a deregulace jeho exprese tak může vést k sensitizaci buněk vůči chemoterapeutikům. Pro zvýšení obecně nízké stability ASOs vůči degradaci nukleasami byly fosfodiesterové vazby v testovaných ASOs nahrazeny vazbami fosforothioátovými. Duální transport ASOs a etoposidu byl pak testován po immobilizaci na povrch vícevrstevných uhlíkových nanotrubelek (MWCNTs z anglického multiwalled carbon nanotubes). Ty byly povrchově oxidovány za účelem maximalizace interfaciální adheze PEG, jenž výrazně zvyšuje vazebnou kapacitu pro ASOs a etoposid oproti nemodifikovaným MWCNTs. Komparativní analýzou reversních a náhodných sekvencí ASOs byla potvrzena selektivita a schopnost námi navržené cílené sekvence inhibovat expresi Bcl-2. Tato inhibice navíc vedla ke značnému zvýšení sensitivity buněk nemalobuněčného karcinomu plic (NCIH2135) vůči etoposidu, což mělo za následek výrazně vyšší míru apoptotických buněk. Hybridní oxidované MWCNTs se tak díky

své biokompatibilitě a extrémní vazebné kapacitě jeví jako zajímavý nástroj pro duální transport bioaktivních molekul.

NANOTOXIKOLOGIE

Nedílnou součástí výzkumu v oblasti využití nanomateriálů v biomedicíně je i popis a pochopení mechanismů zodpovědných za jejich cytotoxicitu, tzv. nanotoxikologie. Nanotoxikologické analýzy tak poskytují důležitý náhled na inherentní chování materiálů v biologickém systému a lze na jejich základě vyloučit takové nanomateriály, které vykazují příliš vysokou nežádoucí cytotoxicitu či identifikovat mechanismy zodpovědné za cytotoxické chování a díky jejich znalosti pak racionálně navrhovat nové typy nanomateriálů s predikovatelnými biologickými vlastnostmi [Oberdorster *et al. Environ. Health Perspect.* **113**, 823/2005/].

V našem výzkumu se primárně soustředíme na nanotoxikologické hodnocení nanomateriálů na bázi TiO₂. Tyto nanomateriály jsou dnes již úspěšně používány nejen v průmyslu, ale také v kosmetice či potravinářství a lze předpokládat, že díky výjimečným fotokatalytickým vlastnostem se bude jejich využití nadále rozvíjet, např. pro účely konverze a skladování energie. Obecně jsou TiO₂-nanomateriály shledávány jako materiály s nízkou toxicitou a jsou proto často testovány jako modifikanty pro ortopedické či dentální implantáty [Wang *et al. Biomaterials* **32**, 6900/2011/]. Toto tvrzení je ale v posledních letech čím dál častěji doplňováno o nové argumenty, přičemž se ukazuje, že nanotoxikologie TiO₂-nanomateriálů je ovlivněna celou řadou vlastností, jako je morfologie, povrchové fyzikálně-chemické parametry či krystalová struktura a z nich vycházející vlastnosti jako je enzymomimetická aktivita, kapacita pro adsorpci iontů, mechanická integrita a další [Wang *et al. Nanoscale* **7**, 13105/2015/, **II-5 a II-6**].

Kromě amorfní formy lze z pohledu krystalové fáze TiO₂-nanomateriály rozdělit na tři hlavní polymorfy: *i*) tetragonální anatas, *ii*) tetragonální rutil a *iii*) orthorhombický brukit.

Běžné jsou i kombinace polymorfů, které dokonce často dosahují lepších fyzikálně-chemických vlastností [Scanlon *et al. Nat. Mater.* **12**, 798/2013/]. Vzhledem k zásadnímu vlivu krystalové fáze na fyzikálně-chemické vlastnosti TiO₂-nanomateriálů tak lze očekávat i rozdílné nanotoxikologické chování. S touto hypotézou jsme syntetizovali dva různé typy nanočástic TiO₂, lišící se poměrem krystalových fází (50:50 vs. 63:37 anatas:brukit). Jak bylo zmíněno výše, nanotoxikologie je ovlivňována celou řadou vlastností nanočástic. Proto bylo důležité připravit nanočástice, které nebudou vykazovat výrazné rozdíly v povrchové chemii. Toho bylo docíleno hydrolyzou/kondenzací isopropoxidu titaničitého v isopropanolu, čímž byly syntetizovány nanočástice s přijatelnou velikostí ~6.0 a ~6.7 nm [II-5]. Analýzou chování v tkáňových kulturách bylo zjištěno, že ačkoliv jsou oba typy nanočástic schopny stejnou měrou internalizovat do intracelulárního prostoru, nanočástice s převažující anatasovou fází vykazují výrazně vyšší inhibici buněčné viability. V souladu s těmito výsledky pak bylo zjištěno, že nanočástice s převažující anatasovou fází produkují vyšší míru oxidačního stresu a fragmentace DNA s následnou indukcí apoptózy. Proteomickou analýzou (separací na dvoudimenzionální diferenční gelové elektroforéze s excisí spotů a jejich digescí a identifikací pomocí MALDI-TOF/TOF "peptide mass fingerprinting") a analýzou bioinformatickou bylo zjištěno, že se buňky snaží bránit cytotoxickému efektu nanočástic zvýšením exprese cytoprotektivních proteinů, a že nanočástice negativně ovlivňují metabolismus glutathionu pravděpodobně jako následek výrazné deregulace redoxní homeostázy.

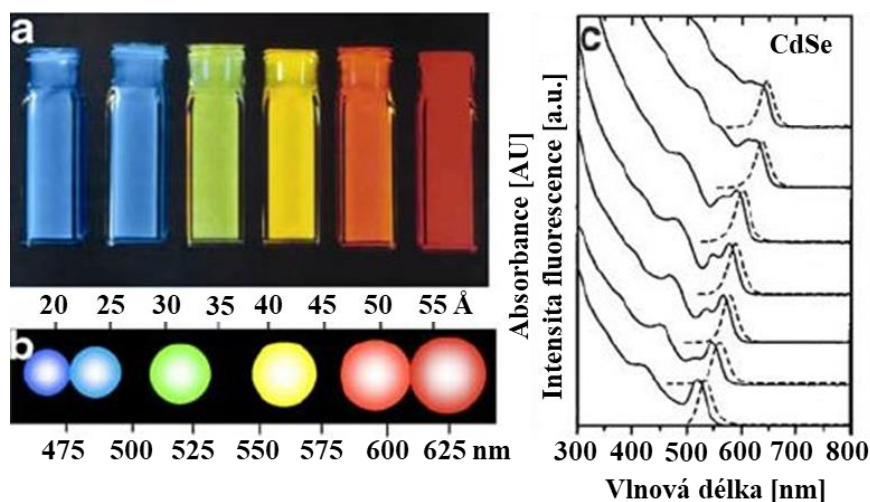
Z pohledu nanotoxikologie TiO₂ jsou bezesporu nejvíce zkoumány 0-D nanomateriály (tedy nanočástice). V posledních letech se ale objevuje stále více studií zkoumajících biologické chování 1-D nanostruktur, většinou nanotrubeček nebo nanovláken. Ty lze například syntetizovat uspořádané do homogenních vrstev, schopných kontrolovaně uvolňovat vázané bioaktivní látky (např. antibiotika) či usnadňovat léčbu zlomenin jejich oseointegrací [Gulati *et al. Nanomedicine* **11**, 1847/2016/]. Nanotoxikologické studie nicméně ukazují, že většina 1-D

nanomateriálů vykazuje určitou míru cytotoxicity a že mechanismy zodpovědné za jejich cytotoxicitu jsou velmi komplexní a stále ne úplně dobře pochopeny [Poland *et al. Nanotoxicology*, **6**, 899/2012/]. Z tohoto důvodu jsme metodou depozice atomových vrstev připravili dva typy vrstev TiO₂-nanotrubek, lišících se pouze délkou (~10 vs. ~35 μm s vnitřním průměrem ~110 nm). Mechanickým rozrušením vrstev pak byly ze substrátu uvolněny svazky nanotrubek, které byly následně testovány [II-6]. Publikované výsledky ukazují, že TiO₂-nanotrubky vykazují ve vyšších koncentracích (>100 μg/mL) cytotoxické vlastnosti. Tyto vlastnosti byly ale pozorovatelné primárně ve tkáňové kultuře buněk karcinomu prsu (MDA-MB-231), kdežto ve zdravých buňkách (HEK-293) cytotoxicita nebyla detekována. Bylo zjištěno, že TiO₂-nanotrubky jsou schopny penetrovat cytoplazmatickou membránu s následným uvolňováním laktát-dehydrogenasy, přičemž tento jev byl pozorovatelný hlavně v buňkách MDA-MB-231. Ačkoliv v práci nebyla studována příčina selektivní penetrace TiO₂-nanotrubek, domníváme se, že tento jev může být způsobený obecnou vyšší fluiditou a nižší rigiditou membrán nádorových buněk [Zhao *et al. Cancer Res.* **76**, 2037/2016]. V dalších experimentech bylo zjištěno, že penetrace membránou má zásadní vliv na isotopní architekturu cytoskeletonu a dochází k signifikantnímu ($p < 0.01$) poklesu koherence F-aktinu. Jako následek penetrace TiO₂-nanotrubek byla identifikována indukce oxidačního stresu, vysoká míra lipidové peroxidace a alkalizace lysosomů. Cytopatologickou analýzou a průtokovou cytometrií pak byla potvrzena schopnost TiO₂-nanotrubek indukovat apoptózu a nekrózu primárně v buňkách MDA-MB-231. Zajímavé je, že ačkoliv je literatura poměrně jednotná v tvrzení, že delší nanotrubky vykazují vyšší cytotoxicitu [Qiu *et al. Biomaterials*, **31**, 7606/2010/], naše výsledky ukazují opačný trend. Je ale nutné zmínit, že dostupné zdroje jsou většinou zaměřené na testování uhlíkových, zlatých či stříbrných nanotrubek, které mají rozdílnou biologickou afinitu a fyzikálně-chemické vlastnosti. I přes to, že testované TiO₂-nanotrubky stimulovaly nežádoucí polarizaci makrofágů a lze si tak jen velmi těžko představit

jejich aplikaci v preklinickém modelu, získaná data by mohla sloužit jako základna pro další vývoj nových modifikovaných derivátů TiO₂-nanotrubek s afinitou k určitým typům buněk.

POLOVODIČOVÉ NANOKRYSTALY – KVANTOVÉ TEČKY

Objev kvantových teček je datován do počátku 80. let minulého století [Ekimov et al. *J. Exp. Theor. Phys.* **34**, 363/1981/]. Díky svým unikátním optoelektronickým vlastnostem jsou dnes kvantové tečky stále předmětem intenzivního výzkumu, a to nejen v oblasti biomedicíny, ale také v oblasti vývoje fotodetektorů, světelných (LED) diod, solárních článků nebo kvantových počítačů [Wagner et al. *Acta Biomater.* **94**, 44/2019/]. Působením excitační energie dochází ve struktuře kvantových teček k tvorbě párů elektronových děr, tzv. excitonů. Relaxací do původního stavu exciton emituje energii ve formě fluorescenčních fotonů. Důležitou a zajímavou vlastností kvantových teček je vztah mezi velikostí a excitačními/emisními vlnovými délkami. Menší kvantové tečky vykazují excitaci/emisi v kratších vlnových délkách, zatímco větší kvantové tečky jsou excitovány a emitují ve vyšších vlnových délkách (Obr. 5).



Obr. 5: (A) Závislost velikosti kvantových teček na jejich emitované barvě. (B) Schematické znázornění závislosti mezi velikostí, barvou a vlnovými délkami (CdSe kvantové tečky). (C) Absorpční (plná čára) a fluorescenční (přerušovaná čára) spektra CdSe kvantových teček o

různých velikostech. [převzato a upraveno z Talapin *et al. Nano Lett.* **1**, 207/2001/]. Použito se souhlasem nakladatele (Americká chemická společnost).

V biomedicínských aplikacích se kvantové tečky využívají především jako reportérové sondy pro fluorescenční zobrazování, jako detekční části biosensorových zařízení nebo teranostické nanotransportéry, tedy nanotransportéry, které jsou schopné současné terapie transportem bioaktivních látek a diagnostiky fluorescenčním zobrazováním. Oproti běžným organickým fluoroforům se kvantové tečky vyznačují celou řadou výhod, mezi které patří široké excitační spektrum s velmi úzkým spektrem emisním a velkým Stokesovým posunem, vysoká intenzita fluorescence, odolnost vůči „vysvícení“ (photobleachingu) a možnost výběru fluorescence v závislosti na aplikaci (od blízké ultrafialové až do blízké infračervené oblasti). To mimo jiné nabízí výraznou redukci nežádoucí autofluorescence tkání a umožňuje expanzi kvantových teček do oblasti experimentálního diagnostického zobrazování [Wegner *et al. Chem. Soc. Rev.* **44**, 4792/2015/]. I přes výše zmíněné výhody ale stále existují i některé nevýhody, které vycházejí především z nanomateriálové a chemické povahy kvantových teček. Oproti organickým fluoroforům se kvantové tečky chovají jako nanokoloidy, což může mít negativní vliv na jejich stabilitu a výslednou toxicitu. Mezi další nevýhody, které se s větším či menším úspěchem daří řešit, je jejich nízká rozpustnost ve vodě, komplikovaná chemie často založená na využití prekurzorů na bázi toxických kovů (Cd, Te, Pb atd.), velmi nízká biologická specifita a následná těžce predikovatelná tkáňová biodistribuce a cytotoxicita [Resch-Genger *et al. Nat. Methods* **5**, 763/2008/].

Podobně jako ostatní nanomateriály lze ale kvantové tečky povrchově modifikovat nejen pro zvýšení jejich biokompatibility, ale také pro dosažení selektivity vůči cílovým buňkám [II-7]. Pro tyto účely byly v naší práci jako jeden z nejčastěji používaných modelů testovány kvantové tečky na bázi CdTe. Ty jsou charakteristické jednoduchou přípravou, vysokým kvantovým výtěžkem, ale také značnou cytotoxicitou, které je způsobena destabilizací struktury

v biologickém prostředí a následným uvolňováním Cd^{2+} z narušené krystalové mřížky [Oh *et al. Nat. Nanotechnol.* **11**, 479/2016/]. Naše práce ukazuje, že stabilizací povrchu CdTe- kvantových teček pomocí dopantů na bázi komplexů lanthanoidů (Tb, Yb a Gd) s Schiffovou bází lze produkovat kvantové tečky s výraznou biokompatibilitou. Kvantové tečky dopované Tb a Yb jsou internalizovány endocytózou a ve velké míře akumulovány v cytoplasmě, přičemž oproti nedopovaným kvantovým tečkám téměř neindukují oxidační stres. Produkované kvantové tečky navíc nevykazují hemolytickou aktivitu *in vitro*, tvorbu proteinových korun a genotoxicitu a lze je tak považovat za zajímavý nanomateriál pro biologické aplikace. Z toho důvodu jsme dále využili náš konjugační systém pro prostorově-orientovanou imobilizaci protilátek popsany v kapitole *Bionanomateriály* [I-7] a funkcionalizovali povrch kvantových teček monoklonální protilátkou proti NET. Experimentálně bylo validováno, že NET vykazuje oproti ostatním testovaným buňkám (A375, PC-3, MDA-MB-231) zvýšenou expresi v buňkách neuroblastomu (SH-SY5Y) a že exprese NET přímo koreluje s množstvím kvantových teček akumulovaných na povrchu analyzovaných buněk. Pro ověření této skutečnosti byl k buňkám SH-SY5Y aplikován vorinostat, který je známým induktorem exprese NET [More *et al. Clin. Cancer Res.* **17**, 2339/2011/]. Získané výsledky ukazují, že množství akumulace kvantových teček na povrchu buněk SH-SY5Y pozitivně koreluje s dobou expozice vorinostatu a expresí NET, a že buňky ani po 24 h nevykazují morfologické známky apoptotických procesů [II-7].

V průběhu práce s kvantovými tečkami dopovanými komplexy Schiffových bází s lanthanoidy bylo zjištěno, že ačkoliv u kvantových teček dopovaných Tb a Yb dochází k internalizaci, kvantové tečky dopované Gd neinternalizují vůbec. V průběhu experimentů bylo navíc náhodně zjištěno, že kvantové tečky dopované Gd akumulují na buňkách s porušenou membránou. Rozhodli jsme se tedy připravit kationický penetrační peptid Hecate (sekvence FALALKALKKALKKALKKAL) odvozený od melitinu, jedné z majoritních složek včelího jedu [Oren *et al. Biochemistry*, **36**, 1826/1997/]. Výsledky ukazují, že Hecate

vykazuje lytickou membránovou aktivitu, a že kvantové tečky jsou akumulovány v místě porušení membrány, což bylo potvrzeno i pomocí kryo-elektronové mikroskopie [II-8]. Pro vyloučení role přítomnosti peptidu pro akumulaci kvantových teček byly buňky dále mechanicky poškozeny skleněnou mikrokapilárou a také kompletně rozbity ultrazvukem. Bylo zjištěno nejen to, že kvantové tečky jsou opravdu akumulované v místě narušení membrány, ale také to, že po absolutním rozrušení buněk ultrazvukem dochází k obarvení prakticky všech buněčných zbytků včetně jaderných membrán. Následnými proteomickými a výpočetními analýzami bylo zjištěno, že Gd-dopované kvantové tečky vykazují vysokou afinitu k motivu GEQGYGFHLHGE ubikvitního endomembránového proteinu NHE-RF2, který spojuje membránové proteiny s proteiny rodiny ezrin/moesin/radixin a napomáhá jejich vazbě na cytoskeleton [Padanyi *et al. J. Biol. Chem.* **285**, 31704/2010/]. Při narušení membrán tak pravděpodobně dochází k obnažení NHE-RF2, což umožňuje vazbu Gd-dopovaných kvantových teček. Získané výsledky představují nový jednoduchý způsob využití dopovaných kvantových teček pro studium membránového poškození, které bylo doposud možné pouze pomocí molekulárních metod nebo drahých elektronových či „próbovacích“ mikroskopů.

SHRNUTÍ BLOKU II

Anorganické nanomateriály jsou díky svým výjimečným vlastnostem intenzivně studovanou skupinou materiálů. Naše práce ukazují, že se tyto materiály mohou uplatnit nejen jako vhodné hybridní nanotransportéry pro imobilizaci, transport a cílené uvolňování bioaktivních molekul. Detailním pochopením vztahů mezi jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, biochemickými a buněčnými procesy lze také získat důležité informace pro další racionální vývoj nových typů biologicky aktivních nanomateriálů pro biomedicínu. Naše práce navíc ukazují, že ačkoliv jsou některé anorganické nanomateriály přirozeně cytotoxické, tato vlastnost může být modulována vhodnou povrchovou funkcionalizací, která navíc může umožnit vizualizaci některých důležitých biochemických procesů.

BLOK III – Autonomní dynamické systémy

Práce prezentované v rámci **třetího bloku** habilitační práce se zabývají autonomními dynamickými systémy pro aplikaci v transportu bioaktivních látek. Autonomní dynamické systémy nebo také mikro- či nanoroboti jsou nejnovější a nejprogresivnější nástroje pro transport biologicky aktivních molekul. Mikro/nanorobot je definován jako programovatelná entita s částečně nebo zcela samostatnými schopnostmi pro mobilitu, rozpoznávání a provádění předdefinovaných úkolů [Ceylan *et al. Lab Chip*, **17**, 1705/2017/]. Autonomní dynamický přístup se výrazně liší od pasivních či aktivních strategií transportu léčiv diskutovaných výše. Mikro/nanorobotické přístupy využívají ke své mobilitě různé zdroje energie, a to např. chemickou, světelnou či magnetickou. To jim umožňuje procházet nepřístupnými nebo obtížně přístupnými částmi organismu, včetně nervového systému [Jarko *et al. Curr Pharm. Des.* **10**, 1341/2004/]. Dynamický pohyb navíc umožňuje markantně zvýšit rychlost cirkulace mikro/nanorobotů v krevním řečišti, což má za následek zvýšení efektivity jejich bioakumulace. Dynamické systémy navíc adaptují výjimečné vlastnosti mikro- a nanomateriálů, jako je velký povrch pro imobilizaci bioaktivních látek a cílicích ligandů nebo ochrana transportovaných látek před degradací a nežádoucím uvolňováním. Kromě léčiv mohou dynamické systémy také transportovat například kmenové nebo progenitorové buňky na místa poškozených tkání [Sungwoong *et al. Sci. Robot.* **4**, 1/2019/].

Autonomní dynamické systémy lze rozdělit na biohybridní a syntetické. Díky výraznému pokroku v materiálových vědách je dnes možné přímo syntetizovat mikro/nanoroboty se zabudovanými funkcionalitami. Syntetičtí mikro/nanoroboti jsou tak dnes schopni dynamického transportu umělé DNA do intracelulárního prostoru, efektivního transportu bioaktivních látek či řízené prostorové manipulace s buňkami [III-1, III-2, III-3 a Qiu *et al. Adv. Funct. Mater.* **24**, 1666/2015/]. Oproti čistě syntetickým mikro/nanorobotům integrují biohybridní dynamické systémy biologické jednotky se syntetickými částmi. Pro tyto účely lze

využít jak eukaryotické, tak bakteriální buňky, které mají vlastní sensorické a pohybové schopnosti. Ty umožňují jejich autonomní řízení směrem k různým podnětům či tkáním [Park *et al. ACS Nano*, **11**, 8910/2017/].

V naší práci se zabýváme především syntetickými mikro/nanoroboty poháněnými katalytickými reakcemi [III-1, III-2 a III-3]. Jedním z nejpreferovanějších chemických pohonů je peroxid vodíku, který je na katalytické vrstvě mikro/nanorobota rozkládán na vodu a kyslík (uvolňovaný ve formě bublin), čímž lze docílit dramatického zvýšení mobility (až o tři řády) v porovnání s Brownovým pohybem [Tu *et al. ACS Nano*, **11**, 1957/2017/]. Ačkoliv je peroxid vodíku cytotoxický, pro indukci mobility autonomních dynamických systémů jsou často dostačující jeho fyziologické hladiny a mikro/nanoroboti mohou být navrženi tak, že v přítomnosti zvýšené hladiny antioxidantů (např. glutathionu) zastaví svůj pohyb a uvolní biologicky aktivní látku [Tu *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 7620/2017/].

Katalytické aktivity zásadní pro mobilitu syntetických autonomních dynamických systémů bývá dosaženo specifickým pokrytím mikro/nanorobotů tenkou vrstvou platiny či stříbra. Ostatní funkcionality autonomních dynamických systémů jsou variabilní a závisí na typu jejich aplikace. Mohou tak být například elektrodepozicí připraveni biokompatibilní tubulární mikroroboti skládající se ze tří vrstev kovů, kdy platina zaručuje mobilitu, nikl schopnost odezvy na vnější magnetické pole a rhombohedrální bismut poskytuje vazebná místa pro imobilizaci kovů či Dox [III-1]. Takto připravení mikroroboti jsou schopni dosahovat rychlosti až 384 $\mu\text{m/s}$ a během pohybu dokáží aplikací potenciálu velmi rychle a efektivně uvolnit Dox, který je následně akumulován v buňkách a působí cytotoxicky. S využitím vnějšího magnetického pole jsme navíc dokázali, že tubulární mikroroboti jsou schopni zpětně navázat velkou část nevyužitého Dox a odstranit jej tak z kultivačního systému. Stejného mechanismu řízeného uvolnění Dox, tedy aplikace potenciálu, jsme využili i při návrhu a testování tubulárních mikrorobotů na bázi redukováného nanografenu s vnitřní katalytickou vrstvou

platiny. Mikroroboti byli schopni pohybovat se rychlostmi vyššími než 700 $\mu\text{m/s}$ a vykazovali velmi vysokou vazebnou kapacitu pro Dox (~154 % geometrického povrchu, pravděpodobně díky porozitě nanografenu) [III-2]. Po aplikaci potenciálu (0.57 V) byly během několika sekund mikroroboti schopni uvolnit téměř veškerý vázaný Dox. Zajímavé je, že bez aplikace potenciálu mikroroboti neuvolňovali žádný Dox a nevykazovali cytotoxicitu vůči testovaným tkáňovým kulturám. Je tedy zřejmé, že vazba Dox na povrch nanografenu (π - π interakce) je dostatečně stabilní proto, aby zabránila předčasnému uvolňování Dox, který je možné efektivně a rychle uvolnit jednoduchou aplikací potenciálu.

Jak již bylo zmíněno výše, autonomní dynamické systémy lze navrhovat nejen pro účely transportu biologicky aktivních látek, lze jim také vhodnou funkcionalizací propůjčit celé spektrum dalších vlastností. V naší další práci tak byli syntetizováni sférickí mikroroboti skládající se z tosylovaného (sulfonyl estery) superparamagnetického jádra na bázi oxidu železa. To bylo naprášeno platinovou vrstvou tak, aby tato vrstva pokrývala přibližně polovinu plochy mikrorobota a umožňovala směrovaný pohyb [III-3]. Naše výsledky ukazují, že tosylové skupiny na povrchu mikrorobotů umožňují kovalentní vazbu s NH_2 skupinami na povrchu buněk, čímž lze s buňkami prostorově manipulovat. Tosylové skupiny lze navíc využít pro vazbu s NH_2 skupinou Dox. Intracelulární akumulace a cytotoxicita Dox je pak přímo závislá na rychlosti pohybu mikrorobotů, což zdůrazňuje důležitost dynamického pohybu pro zefektivnění interakcí s buňkami. Zajímavé je, že mikroroboti jsou schopni pohybu jako samostatné entity, ale dokáží se také vlivem slabého magnetického pole a dipól-dipól interakcí sdružovat do řetízků, čímž dochází ke zvýšení jejich efektivity.

Jako shrnutí třetího bloku habilitační práce lze konstatovat, že ačkoliv je oblast autonomních dynamických systémů stále ještě velmi mladá, vyvinuté publikované koncepty demonstrují velmi zajímavé vlastnosti, kterých není možné docílit pomocí statických, ať už pasivně či aktivně cílených, nanotransportérů. Je samozřejmě také nutné zmínit, že si lze

vzhledem k velikosti a vyšší potřebě peroxidu vodíku pro mobilitu jen těžko představit translaci našich konceptů do reálného scénáře, organismu. Pro vyřešení těchto nedostatků povedou naše další výzkumné kroky směrem zmenšování dynamických systémů do nanoměřítko a také směrem testování nových typů "pohonů" schopných využít látky běžně přítomné v dostatečném množství v krevním řečišti. Zajímavými kandidáty se zdají být například ureasa, glukosa oxidasa a lipasa. Je zjevné, že mnohé aplikace autonomních dynamických systémů ještě nebyly popsány a jen čas ukáže šíři jejich využitelnosti v biomedicině.

Poděkování

Závěrem bych chtěl vyjádřit svůj upřímný dík všem, kteří mi byli oporou, pomáhali při psaní této práce. Nadále pokračující spolupráce s nimi mi nejen umožňuje, ale zároveň mě nutí se neustále odborně rozvíjet. Na prvním místě děkuji prof. RNDr. Vojtěchu Adamovi, Ph.D. za důvěru a za to, že poskytuje mé výzkumné skupině velkou míru svobody, bez níž bychom jistě nebyli tam, kde jsme. Dále děkuji paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. a panu doc. RNDr. Michalu Masaříkovi, Ph.D. za možnost s nimi spolupracovat na zajímavých tématech a za zkušenosti, které mi neustále předávají. Velký dík patří také všem členům mé Výzkumné skupiny molekulární biologie a nanomedicíny za jejich entusiasmus se kterým společně každý den řešíme složité vědecké otázky a za pracovitost díky níž se nám daří nacházet na ně odpovědi. V neposlední řadě bych rád poděkoval své manželce a dětem za skvělé rodinné zázemí, neutuchající podporu a pochopení pro náročnost vědecké práce. Bez nich by totiž nic z toho, o čem v práci píši, nebylo možné.