

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Študijný program: Speciální chemicko-biologické obory  
Študijný obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Pavλίna Javorová**

Biomolekulárna korona u Si a Au nanočastíc a jej vplyv na interakciu s bunkami  
Biomolecular corona of Si and Au nanoparticles and its impact on interaction with cells

Bakalárska práca

Školiteľ: doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2018

Podpis

**Pod'akovanie:**

Chcela by som poďakovať mojej školiteľke doc. RNDr. Marii Hubálek Kalbáčovej za venovaný čas, poskytnuté rady a ústretový prístup počas celej doby vypracovávania tejto práce.

## Abstrakt

Biologická odpoveď na prítomnosť zlatých a kremíkových nanočastíc je intenzívne študovanou oblasťou. Veľmi málo sa ale vie o vplyve ultramalých a malých nanočastíc. Vďaka unikátnym chemicko-fyzikálnym vlastnostiam, ktoré vo veľkej miere súvisia s ich rozmermi sú nanočastice schopné špecifickej interakcie so živým organizmom až na molekulárnej úrovni. Po vstupe nanočastice do komplexného fyziologického prostredia dochádza k adsorbácii molekúl tohto prostredia, prevažne proteínových, k povrchu nanočastice a vytváraniu polymérneho obalu, biomolekulárnej korony. Predpokladá sa, že prvý kontakt nanočastíc s bunkami je sprostredkovaný práve molekulami biokorony na ich povrchu, ktoré majú významnú úlohu aj v ďalších krokoch interakcie komplexu nanočastica-biokorona s bunkou. Popis vzniku a štruktúry biokorony sú preto rovnako dôležitými ako popis samotnej nanočastice. Nanočastice vstupujú a sú internalizované do vnútra bunky a bunkových kompartmentov rovnakými mechanizmami ako využívajú molekuly a látky prirodzene v organizme. Trocha odlišne sa správajú ultramalé a malé nanočastice, ktorých interakcie s bunkami zatiaľ nie sú dobre preskúmané. Odpoveď cicavčích buniek na prítomnosť ultramalých nanočastíc je rôzna a výskumy zatiaľ neodhalili jednotné pravidlá v tejto oblasti. Dôvodom sú pravdepodobne unikátne chemicko-fyzikálne vlastnosti nanočastíc a obrovská fyziologická komplexnosť cicavčieho organizmu.

**Kľúčové slová:** biomolekulárna korona, zlaté nanočastice, kremíkové nanočastice, bunky, proteíny

## **Abstract**

Biological response to presence of gold and silica nanoparticles is extensively researched area of science. However there is only limited knowledge and understanding of the effects of small and ultrasmall nanoparticles. Regarding the unique physical and chemical properties that originate from the small size have these nanoparticles ability to interact very specifically on molecular level with organisms. Once the particle enters the complex physiological environment of the body molecules (predominantly of protein character) adsorb on the surface and form a polymeric case called biomolecular corona. There is a presumption that the first contact of the nanoparticle with the cell is mediated through the molecules of this corona and are important in subsequent steps of interactions of nanoparticle-biocorona complex. Therefore the genesis and structure of biocorona is as essential as the structure of the nanoparticle itself. Nanoparticles enter and are internalized within the cell and cellular compartments through the same mechanisms like naturally occurring molecules and substances. There are slightly different patterns of behavior of small and ultrasmall nanoparticles that are not fully researched and understood. Response of mammalian cells to the presence of the ultrasmall nanoparticles is very variable and research has not yet discovered universal rules regarding this matter. The reason behind this phenomenon is probably the uniqueness of the physical and chemical properties of nanoparticles and broad physiological complexity of mammalian organisms.

**Key words:** biomolecular corona, gold nanoparticles, silica nanoparticles, cells, proteins

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Definovanie nanočastíc .....	1
3	Biomolekulárna korona .....	1
3.1	Hard korona a soft korona .....	3
3.2	Biokorona si zachováva svoju históriu.....	4
3.3	Vplyv inkubačných podmienok na zloženie biokorony .....	4
3.4	Pre-coating .....	5
4	Nanočastice v biologickom prostredí.....	5
4.1	Rozmanitosť zloženia krvnej plazmy .....	5
5	Nanočastice .....	6
6	Vstup nanočastíc do bunky.....	7
6.1	Mechanizmy vstupu materiálu do bunky .....	7
6.1.1	Endocytóza .....	8
6.1.2	Endocytóza klatrínovými vačkami .....	8
6.1.3	Endocytóza kaveolínovými vačkami.....	9
6.1.4	Pinocytóza .....	9
6.1.5	Fagocytóza.....	9
6.1.6	Priamy vstup do buniek.....	10
7	Zlaté nanočastice .....	10
7.1	Kontakt zlatých nanočastíc s cicavčím organizmom.....	10
7.2	Cytotoxita .....	10
7.2.1	Cytotoxicita malých nanočastíc.....	11
7.2.2	Cytotoxicita zlatých nanočastíc vedie k apoptóze aj nekróze .....	11
7.3	Mechanizmu vstupu zlatých nanočastíc do bunky .....	12
7.4	Prekonávanie tkanivových bariér .....	14
8	Kremíkové nanočastice .....	14
8.1	Kontakt kremíkových nanočastíc s cicavčím organizmom .....	14
8.2	Cytotoxita .....	14
8.2.1	Cytotoxicita kremíkových nanočastíc vedie k apoptóze aj nekróze.....	15
8.3	Mechanizmu vstupu kremíkových nanočastíc do bunky.....	15
8.4	Prekonávanie tkanivových bariér .....	17
9	Záver.....	17
10	Zoznam použitej literatúry .....	19

## Zoznam skratiek

ATP	Adenozíntrifosfát	Adenosine triphosphate
AuNP(s)	Zlatá nanočastica (nanočastice)	Gold nanoparticle (nanoparticles)
$\alpha$ MSH	Melanocyty stimulujúci hormón alfa	Alpha-Melanocyte stimulating hormone
C dots	Cornell dots	Cornell dots
FAK	Fokálna adhezívna kináza	Focal adhesion kinase
FXII	Koagulačný faktor, Hagemanov faktor	Coagulation factor, Hageman factor
IgG	Imunoglobulín G	Imunoglobuline G
IL1- $\beta$	Interleukín 1 beta	Interleukine 1 beta
LDH	Laktát-dehydrogenáza	Lactate dehydrogenase
MC-1R	Melanokortínový receptor 1	Melanocortin 1 receptor
NP(s)	Nanočastica (nanočastice)	Nanoparticle (nanoparticles)
PCC	Personalizovaná proteínová korona	Personalized protein corona
RNS	Reaktívne formy dusíku	Reactive nitrogen species
ROS	Reaktívne formy kyslíku	Reactive oxygen species
SiNP(s)	Kremíková nanočastica (nanočastice)	Silica nanoparticle (nanoparticles)
TiO <sub>2</sub> NPs	Nanočastice z oxidu titaničitého	Titanium dioxide nanoparticles
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizujúci faktor alfa	Tumor necrosis factor alpha

# 1 Úvod

Ultramalé nanočastice s priemerom menším ako 10 nm majú unikátne chemicko-fyzikálne vlastnosti a ukazuje sa, že so živým organizmom interagujú inak ako nanočastice s väčším priemerom. Aj keď sú zlaté a kremíkové nanočastice jednými z najviac študovaných o interakcii ultramalých nanočasticiach zo zlata a kremíku na úrovni buniek a molekúl sa veľa nevie. Táto práca má za úlohu predstaviť dostupné informácie o interakcii ultramalých zlatých a kremíkových nanočastic s rôznymi typmi cicavčích buniek. Aj keď je takýchto prác len veľmi málo, hlavne čo sa kremíkových nanočastic týka, interakcia ultramalých nanočastic je unikátna. V tejto práci sú predstavené hlavne mechanizmy vstupu takýchto nanočastic do bunky a bunkových kompartmentov a zmeny, ktoré nanočastice po kontakte s bunkou vyvolávajú. Väčšina z nich nie je objasnených na molekulárnej úrovni. Jedným z dôvodov môže byť podceňovanie biomolekulárnej korony nanočastic v mnohých prácach zaoberajúcich sa biologickou interakciou nanočastic. Preto sa prvá časť tejto práce venuje opisu biomolekulárnej korony z viacerých hľadísk a sumarizuje jej obrovský význam v kontexte bunkovej interakcie. Zároveň poukazuje na nevyhnutnosť študovať interakcie buniek s komplexom nanočastica a jej biokorona.

## 2 Definovanie nanočastic

Nanočastice sú viacerými svetovými organizáciami zaoberajúcimi sa problémami a definíciou materiálov definované veľmi podobne. Rozsiahle správy opisujúce nanoobjekty sa s pribúdajúcimi štúdiami často modifikujú a upravujú. Hlavným a spoločným parametrom pre definovanie nanoobjektov vo všeobecnosti je hodnota ich jedného či viac vonkajších rozmerov v rozsahu veľkostí 1 – 100 nm. Nanočastice môžu zaujímať rôzne tvary a zahrňujú prírodné, náhodne vzniknuté a zámerne vyrobené partikule (Rauscher et al. 2012; WHO 2017; ISO/TS 80004-2:2015 (en) 2015). The International Organization for Standardization definuje nanočasticu ako „nanoobjekt so všetkými vonkajšími rozmermi v nanoškále kde sa dĺžky najdlhšej a najkratšej osi nanoobjektu výrazne nelíšia” (ISO/TS 80004-2:2015 (en) 2015). Za nanoškálu je považovaný „dĺžkový rozsah približne od 1 nm do 100 nm ” (ISO/TS 80004-1:2015(en) 2015). World Health Organization ďalej uvádza, že u nanočastic sa nepredpokladá rovnaké zdravotné riziko ako u príslušného makroskopického materiálu a preto musia byť testované samostatne. Testovanie toxicity nanomateriálov vyžaduje špecificky upravené testovacie metódy (WHO 2017).

Nanočastice sú schopné interakcie s organizmom na úrovni buniek aj tkanív. Po prekonaní fyziologických a imunologických bariér môžu vstupovať až do vnútra jednotlivých buniek a bunkových kompartmentov (Barua a Mitragotri 2014). Dokážu penetrovať zdravé aj nádorové tkanivo so špecifickým vzorcom distribúcie alebo s pomerne rovnomerným rozmiestneným v cieľovej oblasti (Park et al. 2010).

## 3 Biomolekulárna korona

Po kontakte nanočastic s biologickým prostredím dochádza k ich rôznorodej interakcii s aminokyselinami, peptidmi (Nawrocki a Cieplak 2013), proteínmi (Hosseinzadeh et al. 2017), so



samotnými masnými kyselinami (Gupta a Rai 2017), lipidovými molekulami (Hellstrand et al. 2009; Runa et al. 2017) a sacharidovými molekulami (Zeng et al. 2012). Biologické prostredie v podmienkach *in vitro* väčšinou predstavuje kultivačné médiu s obsahom séra (Kokkinopoulou et al. 2017) a *in vivo* experimentoch krv (García-Álvarez et al. 2018). Niektoré molekuly prostredia, väčšinou proteíny, okamžite adsorbujú k povrchu nanočastice a vytvárajú biomolekulárnu koronu, ktorá pokrýva väčšinu povrchu nanočastice (Casals et al. 2010). K priblíženiu procesu formovania biokorony je nevyhnutné skúmať jav adsorpcie proteínov k povrchu zo všeobecnejšieho hľadiska.

Väzba proteínov z prostredia k povrchu prebieha ako viackrokový výmenný proces molekúl, založený na kompetencii o väzbové miesto na povrchu. Postupne sa vytvárajú tranzientné viacvrstvé agregáty, ktoré sa niekoľkokrát preusporadúvajú a čiastočne resorbujú späť do prostredia až nakoniec vytvoria finálnu proteínovú kompozíciu na povrchu materiálu (Hirsh et al. 2013). Adsorpcia je spočiatku veľmi rýchla, ako sa zvyšuje miera pokrytia povrchu materiálom, rýchlosť adsorpcie klesá (Roach et al. 2005).

Pri štúdiu interakcie cudzieho materiálu s komplexným biologickým prostredím sa berie v úvahu tzv. Vromanov efekt. V prvotných fázach dochádza k väzbe vysoko abundantných proteínov v tomto prostredí s pomerne nízkou afinitou k povrchu. Tieto sú následne pozmenené a nahradené menej abundantnými proteínmi s vyššou väzbovou afinitou k tomuto materiálu (Vroman a Adams 1969). Adsorpcia proteínov obsiahnutých v biologickom prostredí je komplexný nešpecifický proces vychádzajúci z jednej či viacerých nekovalentných, čiže neväzbových interakcií medzi rozpúšťadlom a povrchom materiálu, ktoré zahŕňujú Van der Waalove interakcie (Noh a Vogler 2006; Zeng et al. 2012), vodíkové väzby (Sigal et al. 1998), elektrostatické interakcie (Wang et al. 2016a) a hydrofóbne interakcie (Roach et al. 2005).

Proteíny adsorbujú tak, aby bol povrch materiálu pokrytý čo najvyšším možným počtom ich molekúl. Preto je v závislosti na tvare molekuly proteínu samotný proces adsorpcie proteínu k povrchu buď jedнокrokový alebo viackrokový. Pri viackrovej adsorbcií proteínu sú pozorované prestavby, zmeny orientácie celej molekuly, tým dochádza k nárastu počtu hydrofóbnych interakcií medzi adsorbujúcimi molekulami, ktoré tieto procesy prestavby podporujú (Roach et al. 2005). Adezívne sily medzi proteínmi a povrchom stúpajú s ich stúpajúcim kontaktným časom. Rápidny nárast je najmä v prvých sekundách. Tento trend je pozorovaný na hydrofóbnych aj hydrofilných povrchoch (Xu a Siedlecki 2007).

Dôležitým faktorom v adsorbcií proteínov na povrch je miera jeho hydrofobicity resp. hydrofility. Všeobecne pre všetky proteíny platí, že s poklesom miery zrnatosti (klesá hydrofilita, stúpa hydrofobicita) pevného povrchu ku ktorému sú schopné adherovať narastá atraktívna interakcia – adhezívna sila, ktorou sa k tomuto povrchu viažu. Veľké adhézie proteínov k povrchom sú teda pozorované na hydrofóbnych povrchoch (Sethuraman et al. 2004). Je to spôsobené povrchom-indukovanými konformačnými zmenami proteínov. Pravdepodobne dochádza k presunu hydrofóbnych aminokyselín z vnútra molekuly smerom k jej povrchu tak, aby mohlo prísť k interakciám s povrchom častice. S kontaktným časom tiež narastá počet výraznejších prestavieb proteínových molekúl (Hemmerle et al. 1999). Ak je adsorbovaným materiálom proteín s enzymatickou aktivitou, boli tiež pozorované zmeny v jeho enzymatickej aktivite, ktoré súvisia s reorientáciou aktívneho miesta molekúl enzýmu na povrchu. Súčasne sa môže znížiť aj kontaktná plocha na jednu molekulu aby bolo celkové množstvo adsorbovaného materiálu čo najväčšie (Lee a Belfort 1989).

Procesy uvoľňovania a naväzovania proteínov k povrchu nanočastice pri uplatňovaní Vromanovho efektu a zmena štruktúry korony sú dôsledkom zmeny prostredia v ktorom sa nanočastica nachádza. Tieto dôkazy vznikli experimentmi v podmienkach *in vitro*. Predpokladá sa, že takéto zmeny môžu v *in vivo* podmienkach zodpovedať napríklad transportu a distribúcii nanočastice v rámci bunkových kompartmentov a organizmu ako takého. Špecifické molekulárne zloženie biokorony tak nemusí byť len príčinou, ale aj dôsledkom jej lokalizácie (Lundqvist et al. 2011). Zdá sa však, že proces tvorby biokorony na povrchu nanočastice po jej vstupe do komplexného fyziologicky relevantného biologického prostredia nemôže byť charakterizovaný len Vromanovým efektom. Ten sa v kinetike tvorby biokorony uplatňuje, ale je len jednou súčasťou komplexnej kinetiky tohoto procesu, ktorá zatiaľ nie je zcela objasnená (Tenzer et al. 2013).

### 3.1 Hard korona a soft korona

Dynamika proteínovej adsorpčnej vrstvy je charakterizovaná v dvoch časových stupňoch. Za podmienok, že nanočastica je v kontakte s biologickým prostredím dostatočne dlhú dobu, rádovo v hodinách, môžu byť podľa tohoto modelu proteíny viazané v prvej monovrstve a sú súčasťou tzv. hard korony alebo sú súčasťou druhej a tretej vrstvy, tzv. soft korony. V prvom stupni dochádza k vytvoreniu hard korony priamym kontaktom molekúl s povrchom nanočastice. Proteíny sa viažu pomerne silnými väzbami k povrchu NP do podoby monovrstvy. K takýmto väzbám dochádza dovtedy, kým nedôjde k stavu úplnej saturácie monovrstvy. Jej vytvorenie trvá podľa väčšiny zdrojov niekoľko hodín a predstavuje stabilnú štruktúru s veľkým rezidenčným časom molekúl. Vytvorením hard korony dochádza k zníženiu povrchovej voľnej energie nanočastice. Následne sa proteíny viažu s menšou väzbovou silou, reverzibilne a vytvárajú tak druhú a tretiu vrstvu, vonkajšiu soft koronu. Soft korona predstavuje tranzitnú štruktúru, je v dynamickej rovnováhe s voľnými molekulami prostredia a je tak závislá na ich koncentrácii. Jej formácia je veľmi rýchla a v podstate okamžite reaguje na zmenu koncentrácie molekúl okolitého prostredia. Zmeny v konformáciách proteínov či úplnej zmene proteínov soft korony prebiehajú v rádoch minút, takéto zmeny v hard korone prebiehajú len výnimočne a rádovo v hodinách. Z experimentálneho hľadiska je veľmi dôležité, že postupným obalovaným povrchu nanočastice molekulami prostredia dochádza k zväčšeniu polomeru nanočastice. K jeho ustáleniu dochádza až po niekoľkých hodinách. Vznik biokorony na niektorých nanočasticiach zabraňuje ich agregácii v biologickom prostredí (Wang et al. 2016b; Milani et al. 2012; Casals et al. 2010)

Pri skúmaní interakcie nanomateriálu s bunkou alebo tkanivom je predmetom skúmania nie nanočastica samotná, ale nanočastica a jej biokorona zložená z molekúl biologického prostredia (Martel et al. 2011). Biomolekulárna korona určuje odpoveď bunky na prítomnosť nanočastice. Jej stavba ovplyvňuje prvé kroky interakcie s lipidovou dvojvrstvou membránou (Runa et al. 2017) až po vstup, transport a internalizáciu nanočastice do bunky (Lesniak et al. 2012; García-Álvarez et al. 2018; Barrán-Berdón et al. 2013), často ukrýva nanočasticu pred niektorými bunkami imunitného systému (Caracciolo et al. 2015) a zásadne ovplyvňuje mieru cytotoxicity nanočastice (Runa et al. 2017). Predpokladá sa, že zásadný vplyv na biologickú identitu nanočastice má práve hard korona. Je to kvôli veľkej stabilite a malej premenlivosti komplexu nanočastica-hard korona (Walczyk et al. 2010)

Proces vzniku a zloženie biomolekulárnej korony nanočastice sú ovplyvnené mnohými faktormi medzi ktoré patria vlastnosti samotných častíc – veľkosť, rôzne povrchové charakteristiky ako zmáčavosť (Lundqvist et al. 2008), náboj (Lai et al. 2017), tvar a celková plocha adsorpčného povrchu (García-Álvarez et al. 2018). Rovnako aj vlastnosti prostredia – celková a individuálna koncentrácia proteínov (Gräfe et al. 2016), zdroj proteínov (Pisani et al. 2017), mechanizmus adsorpcie jednotlivých proteínov, ich špecifická povrchová hustota (Woods et al. 2016), teplota inkubačného prostredia (Blundell et al. 2016), kontaktný čas nanočastica-biologické prostredie (Xu a Siedlecki 2007). Toto všetko v konečnom dôsledku priamo ovplyvňuje distribúciu, fyziologickú odpoveď a mieru cytotoxicity komplexu nanočastica-biokorona (Mironava et al. 2010).

### **3.2 Biokorona si zachováva svoju históriu**

Pri transporte nanočastice z jedného biologického prostredia do iného (napríklad z biologickej tekutiny do vnútra bunky) dochádza k zmenám molekulárneho zloženia aj v štruktúre hard korony. Aj keď sú tu proteíny viazané k povrchu nanočastice pevnými väzbami, prechodom do iného prostredia dochádza k čiastočnej destabilizácii komplexu nanočastica-korona, niektoré z proteínov disociujú z povrchu a sú nahradené unikátnymi proteínmi druhého prostredia, ktoré majú vyššiu väzbovú afinitu k povrchu nanočastice alebo ku komplexu nanočastica-korona. Dochádza tu k novým interakciám proteín-proteín alebo nanočastica-proteín. To značí o procesoch molekulárnej výmeny v hard korone, ktoré zahŕňujú disociáciu aj integráciu nových proteínov, keď dôjde k zmene okolitého prostredia všeobecne. Konečná štruktúra hard korony odráža evolúciu nanočastice. Vždy čiastočne obsahuje molekuly z pôvodného prostredia aj keď ostáva lokalizovaná v inom prostredí (Lundqvist et al. 2011).

### **3.3 Vplyv inkubačných podmienok na zloženie biokorony**

Po inkubácii nanočastíc s bunkami v prostredí s rôznym obsahom ľudského séra ( 10%, 30%, 50%) boli študované komplexy nanočastica-hard korona. Bez ohľadu na koncentráciu séra v prostredí inkubácie sa percentuálne zastúpenie proteínov hard korony takmer vôbec nelíšilo. Najabudantnejšie boli imunoglobulíny (viac ako 20%) a lipoproteíny (viac ako 10%), komplementové proteíny, proteíny akútnej fáze, sérový albumín a približne 35% tvorili rôzne ďalšie sérové proteíny. Všetky tieto molekuly predstavujú funkčné epitopy nanočastíc, ktoré môžu byť rozpoznávané rôznymi povrchovými receptormi buniek v rámci organizmu a mediovať tak interakciu nanočastice s bunkou (Lara et al. 2017).

Ak boli nanočastice inkubované s bunkami v prostredí bez séra, po priamom kontakte nanočastíc s povrchom bunky došlo k formovaniu biokorony, ktorá obsahovala hlavne cytosolické proteíny, cytoskletárne komponenty a stavebné zložky bunkovej membrány.

Počet internalizácii nanočastíc v podmienkach bez séra bol vyšší ako v prítomnosti séra. Predpokladá sa, že silná adhezivita medzi povrchom nanočastice a povrchom bunky môže byť príčinou vyššieho počtu internalizácii častíc za týchto podmienok (Lesniak et al. 2012).

### 3.4 Pre-coating

Dôkladná štúdia o molekulárnej a morfolologickej charakteristike biokorony sformovanej *in vivo* a jej dôsledok na biodistribúciu zatiaľ nie je. Využíva sa ale tzv. pre-coatingu nanočastíc špecifickými molekulami, väčšinou zhodnými s tými, ktoré sa prirodzene vyskytujú v biologickom prostredí. Po vložení takto modifikovanej častice do biologického prostredia dochádza k formovaniu špecifických koron, ktorých zloženie závisí na type molekuly, ktorá je použitá v pre-coatingu. Následne sa sleduje distribúcia v tkanive alebo organizme a prípadná interakcia na bunkovej úrovni (Ritz et al. 2015; Mirshafiee et al. 2016). Pri použití pre-coatingu je často pozorovaná kolokalizácia nanočastíc so špecifickými molekulami v rámci bunkových kompartmentov alebo cytoplazmy bunky (Estrela-Lopis et al. 2011).

## 4 Nanočastice v biologickom prostredí

Pretože je krv najčastejším biologickým prostredím, v ktorom sa skúma reakcia organizmu na prítomnosť cudzieho substrátu, na bunkovej a molekulárnej úrovni sa sleduje chovanie jej zložiek – najčastejšie proteínových. Krv je pravdepodobne schopná modifikovať povrch každého cudzieho materiálu mnohými odlišnými mechanizmami, ale zároveň tak, aby boli tieto mechanizmy kompatibilné s jej zložením (Vroman et al. 1977).

V závislosti na inkubácii nanočastíc s bunkami v prostredí krvi alebo rôznych krvných frakciách dochádza k formovaniu odlišných biomolekulárnych koron. Nanočastice interagujú s plazmatickými proteínmi vrátane koagulačných faktorov v prostredí krvi alebo krvnej plazmy. V krvi sa nachádzajú aj proteínové deriváty krvných elementov a buniek. Po spracovaní plazmy a separácii koagulačných faktorov vzniká krvné sérum. To sa v podmienkach *in vitro* často pridáva do kultivačného média. Nanočastice tak prichádzajú do styku len so sérovými proteínmi vrátane degradačných produktov koagulačných faktorov (Lundqvist et al. 2017).

### 4.1 Rozmanitosť zloženia krvnej plazmy

Plasma Proteome Database v súčasnosti informuje o detekcii až 10546 proteínov v ľudskej plazme (Nanjappa et al. 2014).

Zloženie krvnej plazmy každého jedinca však nie je rovnaké. Heterogenita zloženia plazmy u ľudí je spôsobená inter- a intraindividuálnymi rozdielmi vzhľadom k pohlaviu, veku a genetickým faktorom (Nanjappa et al. 2014). Okrem primárnych zložiek krvnej plazmy sú tu prítomné proteíny, peptidy a proteínové deriváty pôvodom z rôznych bunkových typov – buniek cirkulujúcich v plazme, špecifických nádorových buniek, rôznych typov tkanív, ale aj z nádorového tkaniva. Rôznorodosť zloženia plazmy súvisí teda aj so zdravotným stavom jedinca (Zhang et al. 2007).

Existuje koncept tzv. personalizovanej proteínovej korony (PCC). Vychádza z predpokladu, že zloženie biokorony nanočastice je determinované zdrojom jej molekúl, najčastejšie plazmou. Preto skupina jedincov s určitým genetickým pozadím, so špecifickým ochorením alebo zdravotným stavom (diabetes, chrípka, rakovina, tehotenstvo, fajčenie a pod.) by mala mať aj náležite špecifické zloženie korony. Bol zistený zásadný vplyv genetického pozadia na molekulárnu stavbu proteínovej korony a jej formáciu

u príslušných skupín jedincov. Pacienti s rovnakým zdravotným stavom vykazujú vyššiu mieru podobnosti vo vzore usporiadania proteínov biokorony. To dokazuje, že adsorbcia proteínov plazmy na povrch nanočastíc je multifaktoriálny proces, v ktorom hrá veľmi dôležitú úlohu zdroj proteínov (Hajipour et al. 2014).

V plazme sú detekované proteíny unikátne pre určitý bunkový či tkanivový typ alebo pre viaceré druhy tkanív, ale tiež proteíny zhodné s tými primárne obsiahnutými v krvnej plazme. K ich uvoľňovaniu do krvi dochádza za fyziologických podmienok, teda *in vivo*. Nie všetky proteíny nachádzajúce sa v plazme už boli identifikované (Zhang et al. 2007). Všeobecne sa jedná o membránovo viazané, sekretované a extracelulárne proteíny patriace do viacerých funkčných skupín (Tirumalai et al. 2003).

Proteín s najhojnejším zastúpením v plazme je albumín. Tvorí viac ako 50 % obsahu plazmatických proteínov (Anderson a Hunter 2006). Je jedným z prvých proteínov viažucich sa na povrch nanočastice pri vstupe do biologického prostredia, ale pomerne rýchlo je čiastočne nahradený menej abundantnými apolipoproteínmi, s vysokou väzbovou afinitou k danému povrchu (Haab et al. 2005). V bunkovej odpovedi na prítomnosť nanočastice sa predpokladá práve ich dôležitý význam. Niektoré apolipoproteíny v krvi asociujú s lipoproteínovými partikulami približne rovnakých rozmerov ako majú nanočastice na ktoré adsorbujú. To môže byť vysvetlením, prečo sú vo finálnej štruktúre biokorony aj napriek svojej nie príliš vysokej koncentrácii v krvi pomerne hojne zastúpené (Cedervall et al. 2007b).

Aby mohlo prísť k adsorbácii proteínu k povrchu, musí dosiahnuť určitej koncentrácie, pri ktorej sa stane povrchovo aktívnym. Niektoré proteíny krvnej plazmy dosahujú pomerne vysokej povrchovej aktivity pri ich fyziologických koncentráciách (albumín, IgG), iné sú pri fyziologickej koncentrácii len veľmi slabo povrchovo aktívne (krvný faktor FXII). Významnou veličinou, ktorá rozhoduje o prvotnej adsorbácii proteínov k rozhraniu je okamžitá koncentrácia daného proteínu v biologickom prostredí, plazme, a nie rozmanitosť molekulárnej štruktúry a z nej vyplývajúci amfifilný charakter molekuly, ktorý má pri tomto deji pravdepodobne zanedbateľný význam. (Krishnan et al. 2004).

V súbore proteínov plazmy sa zdá, že ich schopnosť adsorbovať k materiálu je u všetkých veľmi podobná. Líšia sa ale väzbovou afinitou k povrchu (Cedervall et al. 2007a). Všetky tieto proteíny sú schopné väzby k záporne aj kladne nabitým povrchu nanočastice. Oba typy nanočastíc sú schopné vytvoriť stabilné komplexy nanočastica-proteín. Správanie týchto komplexov je ďalej odlišné, bola pozorovaná najmä afinita k odlišným povrchovým štruktúram bunky a ich využitie (Fleischer a Payne 2012).

Na interakciu nanočastíc s bunkami nemusia mať najsilnejší vplyv majoritne zastúpené molekuly či proteíny v štruktúre biokorony. Zdá sa, že hlavným determinujúcim faktorom bunkovej reakcie a čiastočne miery cytotoxicity sú menej zastúpené proteíny s vyššou väzbovou afinitou k povrchu nanočastice a úzkou špecifitou k určitej bunkovej štruktúre – napríklad povrchovému receptoru (Pisani et al. 2017; Hühn et al. 2013).

## 5 Nanočastice

Nanočastice môžu byť klasifikované na základe mnohých vlastností. Najčastejšie sa charakterizuje ich štruktúra, morfológia, veľkosť a povrchová plocha a viaceré chemicko-fyzikálne vlastnosti popísané

v predošlých kapitolách. V súčasnosti existuje veľké množstvo nanočastíc z rôznych materiálov. NPs na báze uhlíka, kovové NPs, keramické, polymerické, nanočastice na báze lipidov a polovodičové nanočastice (Khan et al. 2017).

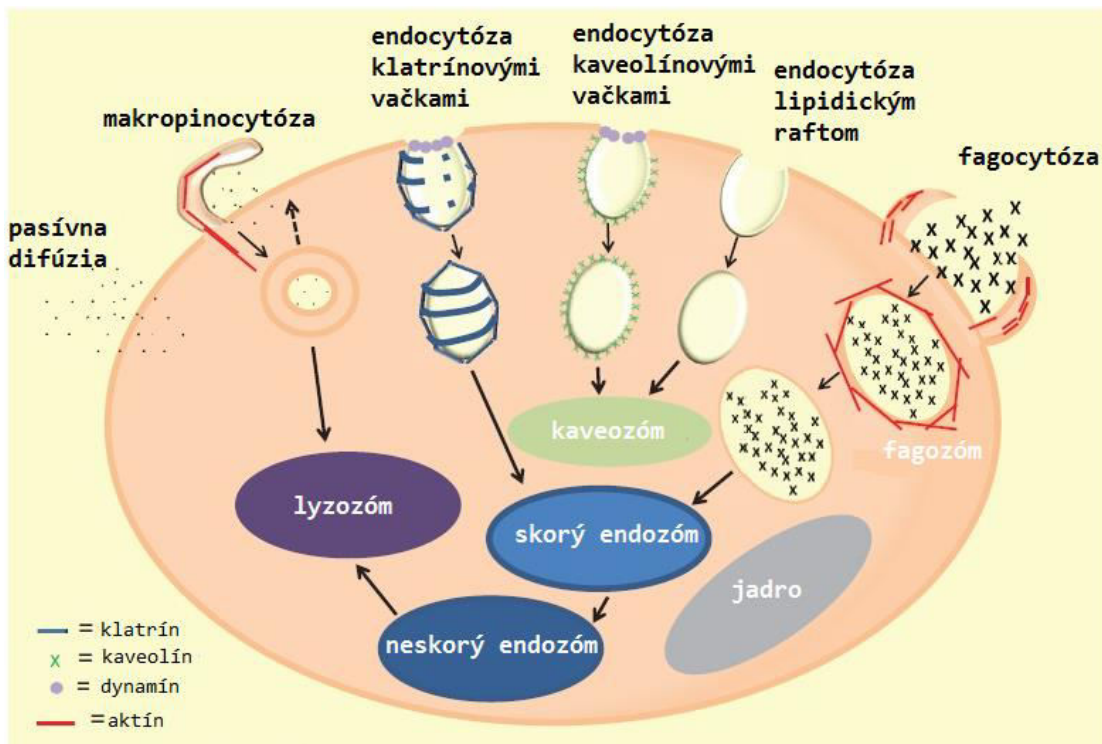
V tejto práci budú popísané kovové zlaté nanočastice a keramické kremíkové nanočastice. V úvode bude stručný popis rôzne veľkých nanočastíc vyrobených zo spomínaných materiálov a pri konkrétnych bunkových interakciách sa zameriam na ultramalé nanočastice a nanočastice s priemerom do 20 nm. Ultramalé nanočastice sú podľa rôznych zdrojov definované rozdielne. Niektorí autori označujú ako, ultramalé nanočastice, partikule s priemerom 2 – 3 nm (Zakhidov et al. 2015) či všeobecne menším ako 10 nm (Yu et al. 2017; Vendamani et al. 2015). V tejto práci je označenie ultramalé nanočastice použité pre partikule s priemerom do 10 nm a ich presná veľkosť je podľa dostupnosti vždy uvedená.

## 6 Vstup nanočastíc do bunky

Porovnávaním tvarovo a veľkostne odlišných nanočastíc majú najvyššiu pravdepodobnosť vstupu do bunky NPs sférického tvaru s priemerom 50 nm. Sú často využívané aj kvôli vysokej biokompatibilite testovanej na mnohých druhoch cicavčích tkanív, kedy aj pri vysokých koncentráciach životnosť buniek znižujú len v malej miere (Chithrani et al. 2006; Ha et al. 2014; Park et al. 2016). Vyššia pravdepodobnosť penetrácie cicavčieho tkaniva, rýchlejšia iniciácia internalizačného mechanizmu a efektívnejšia akumulácia takýchto nanočastíc boli dokázané v experimentoch *in vivo*, *in vitro* aj *ex vivo*. Dôležitým poznatkom je, že nanočastice s priemerom okolo 50 nm dokážu takto efektívne penetrovať tkanivo ako samostatné entity. Pri menších nanočasticiach (napr. 14 nm) bolo pozorované, že do bunky vstupujú až po vytvorení malého zhluku partikulí (Huo et al. 2013; Chithrani a Chan 2007).

### 6.1 Mechanizmy vstupu materiálu do bunky

Nanočastice sú schopné vstupovať do buniek rôznymi mechanizmami. Prvú skupinu tvoria energeticky závislé aktívne procesy endocytickej dráhy, medzi ktoré patria pinocytóza (makropinocytóza pre partikule väčšie ako 1  $\mu\text{m}$ ), receptorom sprostredkovaná klatrínová endocytóza pre partikule s priemerom približne 120 nm, receptorom sprostredkovaná kaveolínová endocytóza pre menšie partikule s priemerom približne 60 nm, klatrín- a kaveolín-independentná endocytóza (napr. cez lipidické rafty) a fagocytóza. Vstup je možný aj procesmi bez spotreby energie, pri ktorých dochádza k špecifickej chemicko-fyzikálnej pasívnej interakcii nanočastíc s membránou bunky (difúzia, adhezívne interakcie). (Obr. č. 1). Neexistuje univerzálne pravidlo pre určenie mechanizmu vstupu do bunky, ale v rámci podobných typov nanočastíc sa dá aspoň predpokladať druh mechanizmu (Rivolta et al. 2012; Yameen et al. 2014).



**Obr. č. 1:** Mechanizmy vstupu materiálu do bunky, prevzaté a upravené z (Rivolta et al. 2012)

V nasledujúcej časti budu popísané hlavné mechanizmy vstupu materiálu do cicavčích buniek. Popisované su najmä morfológické zmeny bunky a prítomnosť typických štruktúr pre daný mechanizmus.

### 6.1.1 Endocytóza

Receptorom sprostredkovaná endocytóza je aktívny proces, pri ktorom dochádza k interakcii (difúzneho) receptoru na povrchu bunky s príslušným (statickým) ligandom na povrchu partikule. V prvom momente dochádza k adhezívnym interakciám partikula-bunka a až potom k priamemu kontaktu medzi receptorom a ligandom. Tento iniciuje invagináciu membrány a pohlcovanie partikule smerom intracelulárne (pučanie vaku) až pokiaľ nepríde ku kontaktu s celým povrchom partikule a vytvorí sa vaku. Zároveň sa hustota receptorov v kontaktnej oblasti zvýši na úroveň hustoty ligandov v danej oblasti difúziou receptorov z blízkeho okolia tejto zóny. Tento proces je veľmi závislý na celkovej veľkosti častice a veľkosti jej povrchu (Gao et al. 2005). V cytoplazme bunky potom detekujeme vaky – endozómy s čiastočne či úplne inkorporovaným materiálom. Typicky sa tvorí skorý endozóm, neskorý endozóm a táto dráha nadväzuje na lyzozomálny kompartment (Cowan et al. 2017).

### 6.1.2 Endocytóza klatrínovými vačkami

Vzniknuté vaky môžu byť obalené klatrínom. Polygonálna klatrínová sieť sa nachádza pod cytoplazmatickou membránou a cez komplex adaptorových proteínov je schopná viazať sa k membráne. Jeden z modelov predpokladá, že rast klatrínových štruktúr začína v podobe planárnej štruktúry diskovitého tvaru tesne pod membránou. Tá rastie a po dosiahnutí dostatočnej veľkosti sa začne ohýbať, vytvorí sa

kopulovitá štruktúra, ktorá sa postupne zakrivuje s ohýbaním membrány až vznikne klatrínom obalený vačok (Bucher et al. 2018).

### **6.1.3 Endocytóza kaveolínovými vačkami**

Morfologicky odlišné obalené vačky, ktoré sú hladké sú tvorené kaveolínom. Kaveolín je proteín exprimovaný v kaveolách, membránových doménach bohatých na sfingolipidy a cholesterol. Receptorom sprostredkovaná endocytóza, ktorá sa uskutočňuje časťou membrány s obsahom tejto domény sa vyznačuje prítomnosťou hladkých obalených kaveolínových endozómov, ktoré vznikajú invagináciou kaveol a ich veľmi dynamickým oddelením od membrány pomocou dynamínu (Le et al. 2002)

### **6.1.4 Pinocytóza**

Pinocytóza je aktívny mechanizmus prijímu látok obsiahnutých v extracelulárnej tekutine do vnútra bunky, ktorý nie je mediovaný receptorom. Príjem väčšieho objemu materiálu sa deje makropinocytózou. Ohybom membrány smerom extracelulárne dochádza k postupnému pohlcovaniu materiálu a vytvoreniu vačky, ktorý sa oddeľuje a pohybuje sa smerom do cytoplazmy. V cytoplazme sú potom detekované veľké vakuoly s inkorporovaným materiálom, tzv. makropinozómy s priemerom väčším ako 0,5  $\mu\text{m}$ . Menší objem materiálu je prijímaný do bunky mikropinocytózou. Lokálnou invagináciou membrány (smerom intracelulárne) je materiál internalizovaný do malého vačky s priemerom menším ako 0,2  $\mu\text{m}$ . Morfologicky sa mikropinocytóza prejavuje aj ako úzky pás zložený z drobných bodiek začínajúci na membráne smerujúci centripetálne (Anzinger et al. 2010; Michael Danielsen a Hansen 2016). Mechanizmus vytvárania pinocytárnych vačkov je aktívne-dependntný a preto vyžaduje prítomný a funkčný aktívny aparát v bunke (Canton et al. 2016).

### **6.1.5 Fagocytóza**

Fagocytóza je špecifický mechanizmus pohlcovania materiálu z prostredia, ktorý je typický re bunky imunitného systému, najmä makrofágy (Zhang et al. 2017). Proces fagocytózy je vždy mediovaný receptorom a prebieha v dvoch štádiách. Najprv dochádza k adhézii a kontaktu fagocytovaného materiálu s membránou, ktorý trvá pár sekúnd, ale proces pohlcovania počas tejto periódy nie je iniciovaný. Dochádza k väzbe ligandu partikule k povrchovému receptoru fagocytu. Následne je pohlcovanie iniciované ohybom a rozširovaním membrány okolo partikule a spočiatku je len veľmi pomalé, ďalej rastie v čase a nasleduje rapídna fáza pohlcovania. Rozširovanie membrány okolo partikule prebieha buď smerom extracelulárne (extrúzia membrány) alebo intracelulárne (invaginácia membrány) ako je to pri endocytóze, závisí to na druhu povrchového receptoru, ktorý fagocytózu sprostredkováva. Fagocytóza je závislá aj na celkovej distribúcii povrchových receptorov, ktorých denzita sa v priebehu procesu samotného pohlcovania v oblasti kontaktného miesta vyrovnáva denzite ligandov na povrchu pohlcovanej partikule. Mechanizmus pohybu receptorov do tejto oblasti je nejasný, uvažuje sa nad voľnou difúziou, aktívnym transportom ale aj kombináciou oboch (Richards a Endres 2014). Po dokončení procesu pohlcovania sa vytvorí cytosolický vačok s pohlteným materiálom – fagozóm. Fagozóm sa aktívne pohybuje majoritne centripetálne, s malými



prerušeniami a pohybom smerom k periférii bunky. Na týchto procesoch sa zúčastňujú aktínové filamenta, mikrotubuly aj molekulárne motory (Keller et al. 2017). Tiež môžu byť pozorované menšie vačky smerujúce k jadru, kde splývajú v jeden veľký fagozóm (Orlando et al. 2014).

### 6.1.6 Priamy vstup do buniek

Pri sledovaní mechanizmu vstupu častíc do bunky sa využíva poznatok, že pokiaľ počas celej doby transportu častice z extracelulárneho priestoru do vnútra bunky nie je táto častica ani po krátky čas membránovo viazaná, indikuje to neendocytický mechanizmus jej vstupu do bunky. Tiež sa používajú rôzne molekuly pre zablokovanie fagocytózy a endocytózy na membráne bunky. V prípade, že nanočastice sú aj napriek tomu detekované v cytoplazme bunky, na procese internalizácie sa nepodieľa aktínový cytoskelet (alebo ho príslušná bunka vôbec nemá), NPs nie sú vôbec viazané k membráne a nie sú detekované žiadne cytosolické vačky s obsahom NPs, autori vyjadrujú predpoklad, že by sa tieto NPs mohli dostať do bunky špecifickými adhezívnymi interakciami, difúziou napr. cez póry. Je veľmi zaujímavé, že Geiser *et al* predpokladajú takýto mechanizmus vstupu do vnútra makrofágov a erytrocytov pre pomerne veľké AuNPs (25 nm) a TiO<sub>2</sub>NPs (100 nm, 200 nm). Ukázalo sa, že voľný vstup NPs do buniek dovoľuje časticiam pomerne voľný presun v rámci kompartmentov daného tkaniva, respektíve orgánu, ktoré sú dobre detekovateľné (Geiser et al. 2005).

Interakcia nanočastíc s rôznym typom cicavčích buniek bude zameraná na popis ich primárnej interakcie s membránou bunky, internalizačný proces a ich dôsledky na morfológiu, metabolizmus a génovú expresiu. Molekulárne zloženie biokorn príslušných nanočastíc nebude opisované nakoľko takéto štúdie dostupné nie sú, ale vychádza sa z predpokladov popísaných v prvej časti tejto práce, a teda že zloženie bikorony je závislé na prostredí, v ktorom sa nanočastica nachádza (konkrétny bunkový kompartment, typ bunky, tkaniva, organizmu).

## 7 Zlaté nanočastice

### 7.1 Kontakt zlatých nanočastíc s cicavčím organizmom

Nanočastice vyrobené zo zlata sú schopné interakcie s cicavčím organizmom na úrovni jednotlivých buniek, tkanív a orgánov. *In vivo* štúdiami bolo dokázané, že dokážu prestupovať rôzne orgány a tkanivá, napríklad pečeň, pľúca, slezinu, krv, srdce, obličky, tenké črevo, mozog, kosti, svaly, pohlavné orgány, a interagovať s nimi na bunkovej úrovni (Morais et al. 2012).

V *in vitro* podmienkach interagujú a vstupujú ultramálé alebo väčšie zlaté nanočastice do rôznych bunkových typov ako sú zdravé či nádorové epitelové bunky, fibroblasty, makrofágy, monocyty, bunky melanomu (Pan et al. 2007) a bunky nervového tkaniva (Nkansah 2013).

### 7.2 Cytotoxita

Vo všeobecnosti nie sú najmä sférické zlaté nanočastice samy považované za cytotoxické a nepreukázal sa ich škodlivý účinok na bunkové funkcie ani po ich internalizácii do vnútra bunky (Chithrani

et al. 2006) a pri ultramalých nanočasticiach do jadra. Nanočastice sú pri použitých koncentráciách a vhodných inkubačných časoch považované za biokompatibilné, ak nie sú pozorované nadmerné známky poškodenia či stresu bunky – nedochádza k viditeľnej zmene morfológie bunky, jadrový obal ostáva intaktný, aktivita mitochondrií ostáva zachovaná a v tkanive nie sú viditeľné apoptotické telieska (Gu et al. 2009). Zlaté nanočastice samy o sebe nemusia byť toxické, ale v závislosti na metóde výroby môžu niektoré ich prekursorzy spôsobovať pri vyšších koncentráciách cytotoxicitu (Connor et al. 2005).

Množstvo nanočastíc nutných pre navodenie cytotoxického efektu a miera poškodenia buniek nanočasticami vyrobenými z rovnakého materiálu závisí na veľkosti nanočastíc, dobe inkubácie s bunkami, konkrétnej povrchovej modifikácii, tvare, aktuálnej koncentrácii NPs a konkrétnom druhu cicavčieho tkaniva s ktorým interagujú. Špecifické kombinácie spomínaných charakteristík sú schopné veľmi výrazne ovplyvniť celkovú mieru cytotoxicity zlatých nanočastíc a viabilitu buniek (Bhamidipati a Fabris 2017; Chueh et al. 2014).

### **7.2.1 Cytotoxicita malých nanočastíc**

Súvislosť veľkosti nanočastíc s ich mierou cytotoxicity bola pozorovaná na ultramalých (3 nm), malých (10 nm) aj veľkých (25 nm, 50 nm) zlatých nanočasticiach s klesajúcim trendom. Ultramalé AuNPs preukázali vysokú cytotoxicitu na nádorové epiteliálne bunky HeLa. Po hodine inkubácie dokázali penetrovať až do jadra, po 12 hod. boli disruptované a nevratne poškodené jadrové membrány u väčšiny buniek. Po 24 hod. boli viditeľné poškodenia na cytoplazmatických membránach všetkých buniek a väčšina oboch druhov membrán bola poškodená nevratne. Rovnaké procesy poškodenia membrán vykazovali aj bunky po inkubácii s chemicky rovnakými nanočasticami, ale s priemerom 10 nm. V tomto prípade však prebiehali procesy poškodenia pomalšie. Prekvapivo sa po 12 hod. dostali do jadra v malom počte aj AuNPs s priemerom 25 nm a 50 nm. Ukázalo sa však, že to je kvôli čiastočnému poškodeniu jadrovej membrány indukovanému z cytoplazmatickej strany po prieniku týchto nanočastíc do vnútra bunky. Toxicita väčších nanočastíc však bola aj podľa miery poškodenia morfológie a zníženia metabolickej aktivity buniek oveľa nižšia než to bolo v prípade ultramalých nanočastíc. Malé nanočastice (3 nm, 10 nm) vstupovali do jadra bez akejkoľvek regulácie (difúziou), väčšie nanočastice sú limitované veľkostnou exkluzivitou komplexu jadrového póru a ich prítomnosť je spojovaná výhradne s cytotoxickým efektom nanočastíc na bunku a to na integritu jadrovej membrány (Boyoglu et al. 2013).

Aj ďalšie štúdie uvádzajú cytotoxický efekt ultramalých zlatých nanočastíc (s priemerom do 1,8 nm) oproti chemicky rovnakým nanočasticiam s priemerom 15 nm, ktoré nevykazovali žiadny cytotoxický účinok (Pan et al. 2007).

### **7.2.2 Cytotoxicita zlatých nanočastíc vedie k apoptóze aj nekróze**

Cytotoxický efekt niektorých AuNPs sa v závislosti na druhu tkaniva, s ktorým interaguje prejavuje rôzne. V ľudských epiteliálnych bunkách mozgu (glioblastom) indukovali AuNPs hviezdicového tvaru apoptotickú dráhu bunkovej smrti – pozorovaná bola kondenzácia periferného chromatinu v jadre, formácia vakuol, zmena morfológie membrány, prítomnosť a aktivita proapoptotických enzýmov (kaspáza-3, proteín-like kaspáza 7) a apoptotické telieska. Rovnaké častice, ale vo fibroblastoch spôsobili poškodenie bunkovej

membrány a mitochondrií čo viedlo k nekróze bunky. V týchto bunkách nebola detekovaná aktivita vyššie spomínaných proapoptotických enzýmov (Bhamidipati a Fabris 2017).

### 7.3 Mechanizmu vstupu zlatých nanočastíc do bunky

Huang *et al* v roku 2012 ako prví dokázali a popísali, že aj príjem ultramalých nanočastíc do bunky závisí na ich veľkosti. Inkubovali sférické zlaté nanočastice s priemerom 2 nm, 6 nm a 15 nm s ľudskou bunkovou líniou adenokarcinómu prs (MCF-7). Po 24 hodinách jasne stanovili, že vo všetkých bunkách je najviac zastúpených AuNPs s priemerom 2 nm a najmenej je tu 15 nm. Pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie dokázali prítomnosť zlatých nanočastíc s priemerom 2 nm a 6 nm nielen v cytoplazme, ale aj v jadre buniek. Pokus opakovali aj v podmienkach *in vivo* intravenóznym podaním nanočastíc do tela myši s nádorom. Pozorovali rovnaký trend v zastúpení AuNPs s príslušnou veľkosťou ako v podmienkach *ex vivo* a tiež distribúciu ultramalých nanočastíc vo viacerých orgánoch ako pri väčších časticiach. Keďže sa v jadre nenachádzali žiadne nanočastice s priemerom 15 nm, na základe poznatku o priepustnosti jadrového póru pre látky s priemerom maximálne 9 – 12 nm (Keminer a Peters 1999), autori článku predpokladajú transport ultramalých nanočastíc do jadra pasívnou difúziou cez komplex jadrového póru a tiež internalizáciu ultramalých AuNPs do bunky voľnou difúziou rovnako ako pri malých molekulách. Mikroskopickou diagnostikou histologických rezov orgánov, v ktorých boli po intravenóznom podaní AuNPs lokalizované (srdce, pľúca, obličky, pečeň, slezina), nedetekovali žiadne mikroskopické zmeny v týchto tkanivách a použité nanočastice boli vyhodnotené ako biokompatibilné (Huang *et al.* 2012). Nie len príjem NPs do bunky, ale aj do jadra je jasne závislý na veľkosti nanočastice. Táto závislosť sa neprejavuje iba v schopnosti voľného prechodu nanočastíc jadrovým pórom, ale aj v ich koncentrácii po dlhodobej inkubácii. Vo všeobecnosti dochádza predlžovaním inkubačnej doby nanočastíc s bunkami k zvýšeniu ich koncentrácie v bunke, prípadne aj v jadre. Zlaté nanočastice s priemerom 2 nm a 6 nm schopné vstupu do jadra zvýšili svoju koncentráciu v jadre aj cytoplazme pri dlhodobej kultivácii, ale celkový počet AuNPs s priemerom 2 nm bol až štyrikrát vyšší ako počet AuNPs s priemerom 6 nm. Schopnosť penetrácie je tak výrazne determinovaná veľkosťou nanočastice (Huo *et al.* 2014).

Pri skúmaní cytotoxicity nanočastíc sa nesleduje len viabilita buniek, ale aj metabolické zmeny, prípadne zmeny na úrovni expresie génov, ktoré prežívanie bunky priamo ovplyvňujú. Po inkubácii zlatých nanočastíc s ľudskými hepatocytmi a ich internalizácii AuNPs ovplyvnili expresiu génov antioxidantných látok, proapoptotických enzýmov a génov podieľajúcich sa prevažne na metabolizme fosfolipidov a liečiv. Bolo pozorované niekoľkonásobné zvýšenie produkcie reaktívnych foriem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Zmeny viedli k zníženiu aktivity transportných systémov na membráne bunky a zníženiu viability hepatocytov (Choi *et al.* 2017). Pri testovaní cytotoxicity AuNPs s priemerom 3,5 nm po dlhodobej inkubácii (24 hodín) s makrofágmi sa prekvapivo preukázal antioxidantný účinok zlatých nanočastíc. Molekulárny mechanizmus však odhalený nebol. Shukla *et al* detekovali pokles koncentrácie oxidu dusného a ROS. Tieto AuNPs neindukovali ani syntézu typických prozápalových cytokínov TNF- $\alpha$  a IL1- $\beta$ . Internalizácia AuNPs do vnútra bunky prebiehala ako aktívny proces a na membráne bunky boli detekované naviazané AuNPs. To nasvedčuje endocytickému mechanizmu transportu. Ten bol potvrdený prítomnosťou AuNPs v lyzozómoch, ktoré boli na základe fotiek z transmisného elektronového mikroskopu lokalizované

perinukleárne. V jadre bunky žiadne AuNPs detekované neboli a jadrová membrána ostala intaktná. Vzhľadom na veľkosť použitých NPs sa najpravdepodobnejším endocytickým mechanizmom vstupu nanočastíc zdá pinocytóza (Shukla et al. 2005).

Podobné rysy boli pozorované aj pri vstupe AuNPs do pľúcnych fibroblastov a hepatocytov. Prvotné zastavenie častíc na povrchu membrány signalizuje endocytický mechanizmus vstupu do bunky. Po ich internalizácii z membrány boli v bunke lokalizované ako samostatné častice v cytoplazme či obalené cytosolickým vačkom, prípadne tvorili zhluky v lyzozóme. Vačky na fotografiách smerovali smerom k jadru a lyzozómy s agregátmi sa vyskytovali hlavne v okolí jeho periferie. Pri zohľadnení veľkosti týchto nanočastíc a použitím špecifických inhibitorov jednotlivých mechanizmov bolo dokázané, že vstup AuNPs s priemerom 20 nm je v oboch typoch tkanív realizovaný klatrínom- mediovanou endocytózou (Ng et al. 2015).

Za použitia metódy nukleárnej magnetickej rezonancie bolo preukázané, že AuNPs s priemerom približne 16,7 nm a povrchovou modifikáciou citrátom sodným vstupujú do dvoch línii buniek glioblastomu fagocytózou. Ich intracelulárna distribúcia bola veľmi podobná v oboch líniiach a nachádzali sa výhradne v cytoplazme bunky. Odpoveď bunky na prítomnosť týchto NPs sa prejavila zväčšením relatívnej intracelulárnej hmotnosti a objemu bunky ( tzv. cellular swelling). Predpokladá sa, že aktívnym vstupom nanočastíc do bunky došlo k zvýšeniu stresu, ktorý mohol zapríčiniť zmenu objemu bunky (Orlando et al. 2014). Zväčšenie jednotlivých bunkových kompartmentov bolo pozorované aj pri endocytickom vstupe zlatých nanočastíc s priemerom 10 nm do buniek obličkového tkaniva. Ovplyvnená bola celá endocytická dráha. Po internalizácii do bunky boli detekované abnormálne zväčšené endozómy, došlo k poškodeniu až zablokovaniu degradačnej aktivity fagozómov v dôsledku čoho sa akumulovali v cytoplazme bunky. Degradácia kapacita lyzozómov bola rapidne znížená alkalizáciou miestneho prostredia a lyzozómy v bunke boli zväčšené. Alkalizácia lyzozómov je pravdepodobne spojená s disociáciou dôležitého štruktúrneho proteínu lyzozomálnej ATP-ázovej pumpy (Ma et al. 2011).

Dôležitosť biomolekulárnej korony v poskytovaní novej identity nanočasticiam a jej vplyv na interakciu s bunkami sú teoreticky opísané v prvej časti tejto práce. Po inkubácii nanočastíc s bunkami v prítomnosti séra a špecifickou povrchovou modifikáciou plazmatickými proteínmi sú tieto poznatky aj experimentálne dokázané. Po inkubácii zlatých nanočastíc s priemerom 14 nm s HeLa bunkami v prostredí plazmy došlo k okamžitej nešpecifickej adsorpcii proteínov k povrchu nanočastice a sformovaniu biokoron, ktoré mediovali vstup nanočastíc do bunky. Došlo k výraznému vzrastu počtu internalizácii NPs do buniek v porovnaní s rovnakými nanočasticami povrchovo modifikovanými len jedným plazmatickým proteínom – transferínom, prípadne citrátom. Tieto nanočastice vstupovali do bunky receptorom sprostredkovanou endocytózou. Rozmanitosť proteínov plazmy, ktoré tvoria biokoronu dovoľujú nanočastici využívať viaceré druhy bunkových receptorov a tak vstupovať do bunky mnohými cestami endocytózy, čo sa prejaví intenzívnejšou internalizáciou častíc (Chithrani et al. 2006). Táto práca uvádza rozmer nasyntetizovanej nanočastice a dokonca potvrdzuje vznik biokorony po styku s biologickým prostredím. Rozmer nanočastice v okamihu interakcie s bunkou v tomto prípade však nie je totožný s veľkosťou NP po jej výrobe. Ako sa spomína v prvej časti tejto práce, po vytvorení biomolekulárnej korony priemer nanočastice vzrastá, ale väčšina prác veľkosť nanočastice po styku s proteínmi neuvádza a často ani neskúma. Pri popise biologickej interakcie nanočastíc je to ale chýbajúci dôležitý údaj.

## 7.4 Prekonávanie tkanivových bariér

Ultramalé AuNPs s priemerom do 6 nm sú schopné prekonávať rôzne bariérové štruktúry – AuNPs s priemerom 1,3 nm samovoľne prestupujú hemato-encefalickú bariéru (Sela et al. 2015), s priemerom 1 – 6 nm ochrannú lipidovú vrstvu kože *stratum corneum* (Gupta a Rai 2016) a s priemerom 6 nm aj hemato-testikulárnu bariéru (Yang et al. 2017).

Zlaté nanočastice s priemerom približne 1,3 nm po intravenóznom podaní penetrovali hematoencefalickú bariéru a boli detekované v rôznych oblastiach mozgu. Aj keď presný mechanizmus transportu cez túto bariéru nebol dokázaný, po použití špecifických blokátorov sodných, draselných a vápnikových iónových kanálov prišlo k poklesu AuNPs detekovaných v mozgu až takmer o 50%. Autori tejto štúdie preto predpokladajú, že použité AuNPs môžu penetrovať hematoencefalickú bariéru aj voľným prechodom cez tieto iónové kanály, ktorých priemer by prechod takto veľkej častice teoreticky dovoľoval. Potvrdili však, že iónové kanály sú schopné priamo či nepriamo regulovať prechod ultramalých AuNPs cez hemato-encefalickú bariéru (Sela et al. 2015).

## 8 Kremíkové nanočastice

### 8.1 Kontakt kremíkových nanočastíc s cicavčím organizmom

Pri intravenóznom podaní je biodistribúcia kremíkových nanočastíc takmer neobmedzená a nanočastice boli detekované v mnohých orgánoch – v slezine, pečeni, obličkách, pľúcach, mozgu, srdci (Yu et al. 2013b) koži, žalúdku, črevách, krvi (Kumar et al. 2010). S týmito orgánmi SiNPs interagujú na bunkovej úrovni, konkrétne bunkové interakcie budú popísané ďalej.

### 8.2 Cytotoxita

Okrem odlišných chemicko-fyzikálnych vlastností vykazujú pri kontakte s bunkami predovšetkým ultramalé nanočastice vyššiu mobilitu, väčšiu schopnosť penetrácie a prechodom cez membránu nespôsobujú mikroskopicky pozorovateľné morfológické zmeny (Gupta a Rai 2016). Bola u nich ale preukázaná vyššia miera cytotoxicity. Napierska *et al* pozorovali cytotoxický účinok SiNPs na ľudské endotelové bunky. Potvrdili tak vplyv veľkosti častíc a koncentrácie na bunkovú viabilitu. Nanočastice s malým priemerom (14 nm – 16 nm) spôsobovali nekrózu buniek už po pár hodinách, s rastom priemeru nanočastíc klesala ich miera cytotoxicity pričom nanočastice s priemerom približne 100 nm vykazovali len zanedbateľnú mieru cytotoxicity (Napierska et al. 2009). Všeobecne sú kremíkové nanočastice väčšie ako 50 nm považované za biokompatibilné, ak spôsobujú cytotoxicitu, tak len v minimálnej miere (Park et al. 2016). Tieto závery sa však nedajú považovať za všeobecne platné. Niektoré experimenty dokazujú, že po vstupe ultramalých kremíkových nanočastíc do cytoplazmy a jadra buniek je ich vplyv na viabilitu buniek minimálny a použité nanočastice boli vyhodnotené ako biokompatibilné (Yu et al. 2014).

Cytotoxický účinok SiNPs bol preukázaný na zdravých aj nádorových líniiach buniek. Vo všeobecnosti je cytotoxicita SiNPs závislá okrem spomínanej veľkosti a koncentrácií nanočastíc v prostredí aj na dobe ich pôsobenia, type tkaniva a dokonca konkrétnej bunkovej línii. Miera cytotoxicity je výsledkom vzájomného pôsobenia mnohých faktorov, ktoré v danom momente akýmkoľvek spôsobom zasahujú do interakcie nanočastíc s biologickým materiálom (Kim et al. 2015).

### **8.2.1 Cytotoxicita kremíkových nanočastíc vedie k apoptóze aj nekróze**

Cytotoxicita kremíkových nanočastíc závisí na type bunky a jej prejav sa líši aj medzi jednotlivými bunkovými líniami. V prípade ľudských fibroblastov SiNPs s priemerom 5 nm – 15 nm ovplyvňovali ich viabilitu len minimálne a tieto nanočastice boli vyhodnotené ako biokompatibilné. Ich cytotoxický účinok bol preukázaný na dvoch bunkových líniiach glioblastomu a v každej línii sa prejav cytotoxicity líšil. V bunkovej línii LBC3 došlo po inkubácii s SiNPs k indukcií apoptózy aj nekrózy zatiaľ čo v línii LN-18 nanočastice indukovali výhradne nekrózu. Morfológické zmeny v LBC3 bunkách sa týkali najmä zmien mitochondrií. Došlo k zväčšeniu ich objemu, deformácii membrán a úplnému pretrhnutiu mitochondriálnych kríst. Pokles mitochondriálneho membránového potenciálu, zvýšenie aktivity kaspázy-9 a expresie proapoptotických génov spojených s mitochondriálnou dráhou apoptózy naznačujú práve tento druh programovanej bunkovej smrti. SiNPs boli lokalizované voľne v cytoplazme alebo naviazané k intracelulárnym membránam a v cytoplazme sa formovali vo zvýšenej miere kyslé vakuoly. V bunke bol detekovaný markerový proteín autofágie a zvýšená koncentrácia génového produktu, ktorá iniciuje proces autofágie (Krętownski et al. 2017). O rok neskôr rovnaký tím vedcov potvrdil výsledky predchádzajúcej štúdie na línii glioblastomových buniek LN229. Detekované boli veľmi podobné zmeny morfológie mitochondrií, metabolické odchýlky a zmeny génovej expresie. V LN229 bunkách indukovali SiNPs aj zvýšenie stresu endoplazmatického retikula, syntézy reaktívnych foriem kyslíku a expresie prozápalových mediátorov a zníženie intracelulárnej koncentrácie ATP (Kusaczuk et al. 2018).

Kremíkové nanočastice sú schopné indukovať autofágiu, nekrózu aj apoptózu vedúce k smrti bunky. Indukcia rovnakých procesov v cicavčích bunkách bola pozorovaná aj u SiNPs s priemerom väčším ako 20 nm (Xin Liu a Sun 2010; Duan et al. 2013).

### **8.3 Mechanizmu vstupu kremíkových nanočastíc do bunky**

Kremíkové nanočastice môžu do bunky vstupovať rôznymi mechanizmami – pasívne, klatrínom-mediovanou endocytózou, makropinocytózou, fagocytózou (Herd et al. 2013). Pri receptorom mediovanou endocytóze bolo pozorované, že dokážu využívať rôzne povrchové receptory, ako CD 44 receptory (Yu et al. 2013a), receptory pre albumín, scavenger receptory. Po endocytóze môžu byť SiNPs lokalizované v lyzozómoch (Sun et al. 2017), môžu byť súčasťou rôznych váčkov alebo sa nachádzať voľne v cytoplazme bunky (Park et al. 2016).

Pri určovaní konkrétneho mechanizmu primárnej interakcie a vstupu nanočastíc do bunky sa okrem sledovania typických morfológických zmien používajú aj zmena teploty inkubácie a špecifické inhibítory jednotlivých mechanizmov. V prvom kroku, pri stanovení energetiky mechanizmu, sa kvantitatívne porovnáva vstup nanočastíc do bunky pri inkubačnej teplote nanočastíc s bunkami 37 °C a 4 °C. Ak je

proces vstupu do bunky energeticky závislý (endocytóza a pod.), počet internalizácií je výrazne vyšší pri inkubácii pri 37 °C a pri teplote 4 °C prebieha len minimálne alebo vôbec. Využitím pasívnych procesov je to presne naopak. Ak je určitá časť procesov vstupu energeticky závislá, použitím špecifických inhibítorov jednotlivých mechanizmov a sledovaním počtu internalizácií za ich použitia sa dá veľmi presne izolovať hlavný mechanizmus, ktorý bunky pri prijímaní nanočastíc využívajú (Herd et al. 2013). Bunka môže využívať energeticky závislé aj nezávislé mechanizmy súčasne a to sa potom prejaví aj v relatívnom pomere internalizácií pri daných teplotách (Zhu et al. 2013).

Z experimentov vyplýva, že aktívnymi procesmi sú internalizované najmä veľké kremíkové nanočastice a s poklesom ich priemeru sú tieto energeticky závislé procesy doplnené aj pasívnymi. Ako sa zdá, energeticky nezávislé procesy nevyužívajú bunky len pre internalizáciu ultramalých kremíkových nanočastíc. Na HeLa bunkách bolo pozorované, že pasívnym spôsobom sa do bunky pravdepodobne môžu dostávať aj SiNPs s priemerom až 55 nm. Presný molekulárny mechanizmus však odhalený nebol (Zhu et al. 2013).

Pre cieleňý transport sú v súčasnosti využívané tzv. Cornell dots (C dots) vyvinuté profesorom Wiesnerom. Tieto ultramálne kremíkové nanočastice sú modifikované naviazaním špecifikej molekuly na svoj povrch, ktorá slúži ako ligand povrchového receptoru buniek určitého tkaniva. C dots s priemerom 7 nm so špecifickou povrchovou modifikáciou polyetylénglykolom a krátkym peptidovým ligandom pre integríny sú schopné vďaka tejto modifikácii viazať v prostredí extracelulárnej matrix molekuly integrínov, cez ktoré sa potom nanočastica viaže využitím integrínového receptoru k endotelovým bunkám a bunkám melanomu. Ak boli C dots s priemerom 6 nm modifikované peptidovým analógom hormónu  $\alpha$ MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone), ktorý sa viaže na viaceré povrchové receptory týchto buniek, do melanocytov vstupovali cez melanokortínový receptor 1 (MC-1R). V oboch prípadoch je majoritne využívaným mechanizmom vstupu do bunky endocytóza mediovaná príslušným receptorom. Nanočastice boli lokalizované v endozomálnych vakuolách s klesajúcim pH, hlavne v neskorých endozómoch a lyzozómoch. V prvom prípade boli pomocou použitia vhodného markeru niektoré endozomálne vakuoly s obsahom nanočastíc označené ako makropinozomy, čo dokazuje, že bunky využili pre internalizáciu SiNPs aj makropinocytózu. Spolu s nanočasticou sa do bunky dostávali aj molekuly integrínu, ktoré spúšťajú príslušné signálne dráhy. Vstupom nanočastíc s integrínmi do bunky došlo v nadmernej miere k aktivácii kľúčovej tyrozínkinázy FAK (focal adhesion kinase). V dôsledku toho sa zvýšila expresia enzýmov príslušných dráh, čo sa prejavilo v intenzívnejšej migrácii a vyššej populácii buniek v S fáze bunkového cyklu a tak zvýšeniu proliferácie (Benezra et al. 2015).

Vplyv C dots modifikovaných analógom  $\alpha$ MSH sa prejavil až v podmienkach aminokyselinovej deprivácie. Pozorované boli morfológické zmeny typické pre nekrózu. Bunky zväčšili svoj objem (tzv. swelling) a následne došlo k prerušeniu integrity plazmatických membrán, vyliatiu ich obsahu do okolitého tkaniva a bunkovej smrti. Nanočastice mali vplyv aj na metabolizmus. V bunkách boli detekované nadmerne oxidované formy lipidov, ktoré nie sú charakteristické pre nekrózu. Pozorovaný typ nekrózy sa vo forme vlny šíril do ostatných buniek. Bunky sú pravdepodobne schopné atypickej komunikácie pomocou signálu indukujúceho špecifický typ bunkovej smrti. Signalizačnú funkciu môžu mať práve oxidované formy lipidov (Kim et al. 2016).

Za rovnakých podmienok boli SiNPs s priemerom 10 nm, 12 nm a 20 nm vo vyššej miere endocytované do makrofágov, pre ktoré je vychytávanie častíc z prostredia prirodzené v porovnaní s bunkami pľúcneho epitelu s pôvodne bariérovou funkciou. Predpokladá sa, že funkčné vlastnosti jednotlivých bunkových typov odrážajú mieru internalizácie kremíkových nanočastíc do týchto buniek. Bunkové funkcie výrazne ovplyvnili práve SiNPs s priemerom 12 nm. Tieto nanočastice výrazne znížili koncentráciu intracelulárneho ATP, zvýšili exkréciu LDH (laktát-dehydrogenáza) a zápalových mediátorov u oboch typov buniek. Výrazne senzitivnejšie boli k pôsobeniu týchto nanočastíc makrofágy, u ktorých došlo k zníženiu proliferácie. Nanočastice s priemerom 10 nm a 20 nm na proliferáciu buniek žiadny vplyv nemali a ostatné spomínané funkcie ovplyvnili menej výrazne. Kremíkové nanočastice ovplyvnili aj ďalšie bunkové funkcie v závislosti na type bunky. U epitelových buniek bol ovplyvnený metabolizmus lipidov, štruktúra malých molekúl, molekulárny transport a signalizácia. Zmeny morfológie bunky, signalizácie a bunkových interakcií vyvolali nanočastice u makrofágov (Breznan et al. 2017).

#### 8.4 Prekonávanie tkanivových bariér

Podobne ako zlaté nanočastice aj nanočastice z kremíku boli detekované v orgánoch a bunkách, ktorým predchádzalo nevyhnutné prekonanie tkanivových bariér. Pozorovaný bol prechod cez hemato-encefalickú bariéru v podmienkach *in vitro* aj *in vivo*. Na štruktúre hemato-encefalickej bariéry sa podieľajú tiež epitelové bunky s interepitelovými otvormi a tesnými spojmi medzi susednými bunkami so šírkou menej ako 18 nm a 8 nm. Penetrácie sú schopné aj veľké nanočastice s priemerom až do 100 nm, čo jasne vylučuje pasívny mechanizmus penetrácie. Efektívnosť vstupu nanočastíc však väčšinou klesá s rastom ich priemeru (Liu et al. 2014; Mo et al. 2016). Modifikáciou SiNPs laktoferínom môžu vstupovať SiNP nanočastice s priemerom 25 nm endocytózou mediovanou laktoferínovým receptorom, ktorý sa nachádza na povrchu týchto epitelových buniek (Song et al. 2017).

Kremíkové nanočastice penetrovali aj semenníky a nachádzali sa vo vnútri spermatogénnych buniek čo je dôkazom o prekonaní hemato-testikulárnej bariéry (Ren et al. 2016).

Vo veľmi malej miere SiNPs s priemerom 50 nm prekonali aj tkanivovú bariéru čreva, ktorej základom je epitel (Ye et al. 2017).

Je zaujímavé, že prechod cez tkanivové bariéry je v prípade kremíkových nanočastíc opisovaný v súvislosti s nanočasticami s priemerom väčším ako majú typické ultramale nanočastice. V prípade zlatých nanočastíc, ako je popísané skôr v tejto práci, častejšie prekonávajú bariéry práve ultramale častice.

## 9 Záver

Zlaté a kremíkové ultramale nanočastice sú schopné interagovať s rôznymi bunkami. Reakcia buniek na prítomnosť nanočastice je závislá na type a dokonca aj konkrétnej línii buniek. K štúdiu sú používané rôzne skupiny buniek a vedci sa snažia nájsť závislosť medzi bunkovým typom a jeho odpoveďou na prítomnosť ultramalých nanočastíc.

Ultramale nanočastice interagujú s cicavčiami bunkami inak ako nanočastice väčších rozmerov. Výrazné rozdiely sú viditeľné najmä na procesoch vstupu do bunky a bunkových kompartmentov, kedy



využívajú rozdielne internalizačné mechanizmy, ktoré v mnohých prípadoch nie sú objasnené na molekulárnej úrovni a jasne definované. Ich unikátne charakteristiky, ako vyššia mobilita a väčšia schopnosť penetrácie vychádzajúce z chemicko-fyzikálnych vlastností sú často spájané s možnou cytotoxicitou. Doterajšie experimenty však jasne nepotvrdzujú výraznú cytotoxicitu ultramalých nanočastíc.

Kontakt s bunkou prebieha ako interakcia bunky s komplexom nanočastica-biokorona. Pretože po vstupe nanočastíc do biologického prostredia adsorbujú molekuly z tohto prostredia na povrch nanočastice tak, aby pokryli čo najväčšiu plochu, priamych kontaktov medzi nanočasticou a bunkou je len zanedbateľné množstvo. Biokorona má dôležitú úlohu vo všetkých stupňoch interakcie so živým organizmom, ale aj napriek tomu ju väčšina prác neskúma a jej vplyv na tieto deje zanedbáva. Pri štúdiu biologickej interakcie by malo byť kľúčové, že táto interakcia prebieha s komplexom nanočastica-biokorona a experimenty by mali byť zostavené tak, aby popri charakterizácii nanočastice detailnejšie popisovali aj molekulárnu štruktúru jej biomolekulárnej korony.

V tejto práci som sa snažila zhrnúť aktuálne poznatky o interakcii ultramalých a malých zlatých a kremíkových nanočastíc s cicavčími bunkami. Aj keď je dnes výskum biologickej interakcie nanočastíc dynamicky sa rozvíjajúcou oblasťou vedy, stále je v začiatkoch úplného pochopenia a predovšetkým v oblasti ultramalých nanočastíc. Málo preskúmanou problematikou sú najmä ultramale kremíkové nanočastice, na ktoré by som sa rada zamerala v budúcich rokoch svojho štúdia.

## 10 Zoznam použitej literatúry

\* sekundárne citácie

ANDERSON, Leigh a Christie L. HUNTER, 2006. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2006, roč. 5, č. 4, s. 573–588.

ANZINGER, Joshua J, Janet CHANG, Qing XU, Chiara BUONO, Yifu LI, Francisco J LEYVA, B.-C. PARK, Lois E GREENE a Howard S KRUTH, 2010. Native Low-Density Lipoprotein Uptake by Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Macrophages Is Mediated by Macropinocytosis and Micropinocytosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2010, roč. 30, č. 10, s. 2022–2031.

BARRÁN-BERDÓN, Ana Lilia, Daniela POZZI, Giulio CARACCILO, Anna Laura CAPRIOTTI, Giuseppe CARUSO, Chiara CAVALIERE, Anna RICCIOLI, Sara PALCHETTI a Aldo LAGANÀ, 2013. Time Evolution of Nanoparticle–Protein Corona in Human Plasma: Relevance for Targeted Drug Delivery. *Langmuir* [online]. 2013, roč. 29, č. 21, s. 6485–6494.

\*BARUA, Sutapa a Samir MITRAGOTRI, 2014. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* [online]. 2014, roč. 9, č. 2, s. 223–243.

BENEZRA, Miriam, Evan PHILLIPS, Michael OVERHOLTZER, Pat B. ZANZONICO, Esa TUOMINEN, Ulrich WIESNER a Michelle S. BRADBURY, 2015. Ultrasmall integrin-targeted silica nanoparticles modulate signaling events and cellular processes in a concentration-dependent manner. *Small* [online]. 2015, roč. 11, č. 14, s. 1721–1732.

BHAMIDIPATI, Manjari a Laura FABRIS, 2017. Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2017, roč. 28, č. 2, s. 449–460.

BLUNDELL, Emma L. C. J., Matthew J. HEALEY, Elizabeth HOLTON, Muttuswamy SIVAKUMARAN, Sarabjit MANSTANA a Mark PLATT, 2016. Characterisation of the protein corona using tunable resistive pulse sensing: determining the change and distribution of a particle's surface charge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, roč. 408, č. 21, s. 5757–5768.

BOYOGLU, Cemil, Qingwen HE, Gerold WILLING, Seyhan BOYOGLU-BARNUM, Vida A. DENNIS, Shreekumar PILLAI a Shree R. SINGH, 2013. Microscopic Studies of Various Sizes of Gold Nanoparticles and Their Cellular Localizations. *ISRN Nanotechnology* [online]. 2013, roč. 2013, s. 1–13.

BREZNAN, Dalibor, Dharani D. DAS, Julie S. O'BRIEN, Christine MACKINNON-ROY, Surendra NIMESH, Ngoc Q. VUONG, Stéphane BERNATCHEZ, Nimal DESILVA, Myriam HILL, Prem KUMARATHASAN a Renaud VINCENT, 2017. Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines. *Nanotoxicology* [online]. 2017, roč. 11, č. 2, s. 223–235.

BUCHER, Delia, Felix FREY, Kem A. SOCHACKI, Susann KUMMER, Jan-Philip BERGEEST, William J. GODINEZ, Hans-Georg KRÄUSSLICH, Karl ROHR, Justin W. TARASKA, Ulrich S. SCHWARZ a Steeve BOULANT, 2018. Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nature Communications* [online]. 2018, roč. 9, č. 1, s. 1109.

CANTON, Johnathan, Daniel SCHLAM, Christian BREUER, Michael GÜTSCHOW, Michael GLOGAUER a Sergio GRINSTEIN, 2016. Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nature Communications* [online]. 2016, roč. 7, s. 11284.

CARACCILO, Giulio, Sara PALCHETTI, Valentina COLAPICCHIONI, Luca DIGIACOMO, Daniela POZZI, Anna Laura CAPRIOTTI, Giorgia LA BARBERA a Aldo LAGANÀ, 2015. Stealth Effect of Biomolecular Corona on Nanoparticle Uptake by Immune Cells. *Langmuir* [online]. 2015, roč. 31, č. 39, s. 10764–10773.

- CASALS, Eudald, Tobias PFALLER, Albert DUSCHL, Gertie Janneke OOSTINGH a Victor PUNTES, 2010. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* [online]. 2010, roč. 4, č. 7, s. 3623–3632.
- CEDERVALL, T., I. LYNCH, S. LINDMAN, T. BERGGÅRD, E. THULIN, H. NILSSON, K. A. DAWSON a S. LINSE, 2007a. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, roč. 104, č. 7, s. 2050–2055.
- CEDERVALL, Tommy, Iseult LYNCH, Martina FOY, Tord BERGGÅRD, Seamas C. DONNELLY, Gerard CAGNEY, Sara LINSE a Kenneth A. DAWSON, 2007b. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, roč. 46, č. 30, s. 5754–5756.
- CHITHRANI, B. Devika a Warren C W CHAN, 2007. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Letters* [online]. 2007, roč. 7, č. 6, s. 1542–1550.
- CHITHRANI, B Devika, Arezou A GHAZANI a Warren C W CHAN, 2006. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* [online]. 2006, roč. 6, č. 4, s. 662–668.
- CHOI, Kyoungju, Jim E. RIVIERE a Nancy A. MONTEIRO-RIVIERE, 2017. Protein corona modulation of hepatocyte uptake and molecular mechanisms of gold nanoparticle toxicity. *Nanotoxicology* [online]. 2017, roč. 11, č. 1, s. 64–75.
- CHUEH, Pin Ju, Ruei-Yue LIANG, Yi-Hui LEE, Zih-Ming ZENG a Show-Mei CHUANG, 2014. Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2014, roč. 264, č. 2014, s. 303–312.
- CONNOR, Ellen E., Judith MWAMUKA, Anand GOLE, Catherine J. MURPHY a Michael D. WYATT, 2005. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* [online]. 2005, roč. 1, č. 3, s. 325–327.
- COWAN, Douglas B., Rouan YAO, Jerusha K. THEDSANAMOORTHY, David ZURAKOWSKI, Pedro J. DEL NIDO a James D. MCCULLY, 2017. Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 17450.
- DUAN, Junchao, Yongbo YU, Yang LI, Yang YU, Yanbo LI, Xianqing ZHOU, Peili HUANG a Zhiwei SUN, 2013. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 4, s. e62087.
- ESTRELA-LOPIS, I., G. ROMERO, E. ROJAS, S. E. MOYA a E. DONATH, 2011. Nanoparticle uptake and their co-localization with cell compartments – a confocal Raman microscopy study at single cell level. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2011, roč. 304, č. 1, s. 012017.
- FLEISCHER, Candace C. a Christine K. PAYNE, 2012. Nanoparticle surface charge mediates the cellular receptors used by protein-nanoparticle complexes. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2012, roč. 116, č. 30, s. 8901–8907.
- GAO, Huajian, Wendong SHI a Lambert B FREUND, 2005. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, roč. 102, č. 27, s. 9469–9474.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, Rafaela, Marilena HADJIDEMETRIOU, Ana SÁNCHEZ-IGLESIAS, Luis M. LIZMARZÁN a Kostas KOSTARELOS, 2018. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale* [online]. 2018, roč. 10, č. 3, s. 1256–1264.
- GEISER, Marianne, Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER, Nadine KAPP, Samuel SCHÜRCH, Wolfgang KREYLING, Holger SCHULZ, Manuela SEMMLER, Vinzenz Im HOF, Joachim HEYDER a Peter GEHR, 2005. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2005, roč. 113, č. 11, s. 1555–1560.

- GRÄFE, Christine, Andreas WEIDNER, Moritz V.D. LÜHE, Christian BERGEMANN, Felix H. SCHACHER, Joachim H. CLEMENT a Silvio DUTZ, 2016. Intentional formation of a protein corona on nanoparticles: Serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle–cell interaction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2016, roč. 75, s. 196–202.
- GU, Yan Juan, Jinping CHENG, Chun Chi LIN, Yun Wah LAM, Shuk Han CHENG a Wing Tak WONG, 2009. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, roč. 237, č. 2, s. 196–204.
- GUPTA, Rakesh a Beena RAI, 2016. Penetration of Gold Nanoparticles through Human Skin: Unraveling Its Mechanisms at the Molecular Scale. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2016, roč. 120, č. 29, s. 7133–7142.
- GUPTA, Rakesh a Beena RAI, 2017. Effect of Size and Surface Charge of Gold Nanoparticles on their Skin Permeability: A Molecular Dynamics Study. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. February, s. 45292.
- HA, Shin-Woo, James A. SIKORSKI, M. Neale WEITZMANN a George R. BECK, 2014. Bio-active engineered 50nm silica nanoparticles with bone anabolic activity: Therapeutic index, effective concentration, and cytotoxicity profile in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2014, roč. 28, č. 3, s. 354–364.
- HAAB, Brian B., Bernhard H. GEIERSTANGER, George MICHAILIDIS, Frank VITZTHUM, Sara FORRESTER, Ryan OKON, Petri SAVIRANTA, Achim BRINKER, Martin SORETTE, Lorah PERLEE, Shubha SURESH, Garry DRWAL, Joshua N. ADKINS a Gilbert S. OMENN, 2005. Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: Systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *PROTEOMICS* [online]. 2005, roč. 5, č. 13, s. 3278–3291.
- HAIPOUR, Mohammad J., Sophie LAURENT, Afsaneh AGHAIE, Farhad REZAEI a Morteza MAHMOUDI, 2014. Personalized protein coronas: a “key” factor at the nanobiointerface. *Biomaterials Science* [online]. 2014, roč. 2, č. 9, s. 1210.
- HELLSTRAND, Erik, Iseult LYNCH, Astra ANDERSSON, Torbjörn DRAKENBERG, Björn DAHLBÄCK, Kenneth A. DAWSON, Sara LINSE a Tommy CEDERVALL, 2009. Complete high-density lipoproteins in nanoparticle corona. *FEBS Journal* [online]. 2009, roč. 276, č. 12, s. 3372–3381.
- HEMMERLE, J., S M ALTMANN, M MAALOUM, J. K. H. HORBER, L HEINRICH, J C VOEGEL a P SCHAAF, 1999. Direct observation of the anchoring process during the adsorption of fibrinogen on a solid surface by force-spectroscopy mode atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, roč. 96, č. 12, s. 6705–6710.
- HERD, Heather, Nicole DAUM, Arwyn T. JONES, Hanno HUWER, Hamidreza GHANDEHARI a Claus Michael LEHR, 2013. Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. *ACS Nano* [online]. 2013, roč. 7, č. 3, s. 1961–1973.
- HIRSH, Stacey L., David R. MCKENZIE, Neil J. NOSWORTHY, John A. DENMAN, Osman U. SEZERMAN a Marcela M.M. BILEK, 2013. The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2013, roč. 103, s. 395–404.
- HOSSEINZADEH, Ghader, Ali MAGHARI, S. Morteza F. FARNIA a Ali A. MOOSAVI-MOVAHEDI, 2017. Interaction mechanism of insulin with ZnO nanoparticles by replica exchange molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2017, roč. 1102, s. 1–13.
- HUANG, Keyang, Huili MA, Juan LIU, Shuaidong HUO, Anil KUMAR, Tuo WEI, Xu ZHANG, Shubin JIN, Yaling GAN, Paul C. WANG, Shengtai HE, Xiaoning ZHANG a Xing Jie LIANG, 2012. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano* [online]. 2012, roč. 6, č. 5, s. 4483–4493.
- HÜHN, Dominik, Karsten KANTNER, Christian GEIDEL, Stefan BRANDHOLT, Ine DE COCK, Stefaan J. H. SOENEN, Pilar RIVERA\_GIL, Jose-Maria MONTENEGRO, Kevin BRAECKMANS, Klaus MÜLLEN, G. Ulrich NIENHAUS, Markus KLAPPER a Wolfgang J. PARAK, 2013. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *ACS Nano*

[online]. 2013, roč. 7, č. 4, s. 3253–3263.

HUO, Shuaidong, Shubin JIN, Xiaowei MA, Xiangdong XUE, Keni YANG, Anil KUMAR, Paul C. WANG, Jinchao ZHANG, Zhongbo HU a Xing Jie LIANG, 2014. Ultrasmall gold nanoparticles as carriers for nucleus-based gene therapy due to size-dependent nuclear entry. *ACS Nano* [online]. 2014, roč. 8, č. 6, s. 5852–5862.

HUO, Shuaidong, Huili MA, Keyang HUANG, Juan LIU, Tuo WEI, Shubin JIN, Jinchao ZHANG, Shengtai HE a X.-J. LIANG, 2013. Superior Penetration and Retention Behavior of 50 nm Gold Nanoparticles in Tumors. *Cancer Research* [online]. 2013, roč. 73, č. 1, s. 319–330.

KELLER, S., K. BERGHOFF a H. KRESS, 2017. Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 17068.

KEMINER, Oliver a Reiner PETERS, 1999. Permeability of Single Nuclear Pores. *Biophysical Journal* [online]. 1999, roč. 77, č. 1, s. 217–228.

\*KHAN, Ibrahim, Khalid SAEED a Idrees KHAN, 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2017.

KIM, In-Yong, Elizabeth JOACHIM, Hyungsoo CHOI a Kyekyoon KIM, 2015. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2015, roč. 11, č. 6, s. 1407–1416.

KIM, Sung Eun, Li ZHANG, Kai MA, Michelle RIEGMAN, Feng CHEN, Irina INGOLD, Marcus CONRAD, Melik Ziya TURKER, Minghui GAO, Xuejun JIANG, Sebastien MONETTE, Mohan PAULIAH, Mithat GONEN, Pat ZANZONICO, Thomas QUINN, Ulrich WIESNER, Michelle S. BRADBURY a Michael OVERHOLTZER, 2016. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nature Nanotechnology* [online]. 2016, roč. 11, č. 11, s. 977–985.

KOKKINOPOULOU, Maria, Johanna SIMON, Katharina LANDFESTER, Volker MAILÄNDER a Ingo LIEBERWIRTH, 2017. Visualization of the protein corona: towards a biomolecular understanding of nanoparticle-cell-interactions. *Nanoscale* [online]. 2017, roč. 9, č. 25, s. 8858–8870.

KRĘTOWSKI, Rafał, Magdalena KUSACZUK, Monika NAUMOWICZ, Joanna KOTYŃSKA, Beata SZYNAKA a Marzanna CECHOWSKA-PASKO, 2017. The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomaterials* [online]. 2017, roč. 7, č. 8, s. 230.

KRISHNAN, Anandi, Jacqueline STURGEON, Christopher A SIEDLECKI a Erwin A VOGLER, 2004. Scaled interfacial activity of proteins at the liquid-vapor interface. *Journal of biomedical materials research. Part A* [online]. 2004, roč. 68, č. 3, s. 544–57.

KUMAR, Rajiv, Indrajit ROY, Tymish Y. OHULCHANSKKY, Lisa A. VATHY, Earl J. BERGEY, Munawwar SAJJAD a Paras N PRASAD, 2010. In Vivo Biodistribution and Clearance Studies Using Multimodal Organically Modified Silica Nanoparticles. *ACS Nano* [online]. 2010, roč. 4, č. 2, s. 699–708.

KUSACZUK, Magdalena, Rafał KRĘTOWSKI, Monika NAUMOWICZ, Anna STYPUŁKOWSKA a Marzanna CECHOWSKA-PASKO, 2018. Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, roč. Volume 13, s. 2279–2294.

LAI, Wenjia, Qingsong WANG, Lumeng LI, Zhiyuan HU, Jiankui CHEN a Qiaojun FANG, 2017. Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding patterns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017, roč. 152, s. 317–325.

LARA, Sandra, Fatima ALNASSER, Ester POLO, David GARRY, Maria Cristina LO GIUDICE, Delyan R. HRISTOV, Louise ROCKS, Anna SALVATI, Yan YAN a Kenneth A. DAWSON, 2017. Identification of Receptor Binding to the Biomolecular Corona of Nanoparticles. *ACS Nano* [online]. 2017, roč. 11, č. 2, s. 1884–1893.

LE, Phuong U., Ginette GUAY, Yoram ALTSCHULER a Ivan R. NABI, 2002. Caveolin-1 is a negative

regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, roč. 277, č. 5, s. 3371–3379.

LEE, C S a G BELFORT, 1989. Changing activity of ribonuclease A during adsorption: a molecular explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1989, roč. 86, č. 21, s. 8392–8396.

LESNIAK, Anna, Federico FENAROLI, Marco P. MONOPOLI, Christoffer ÅBERG, Kenneth A. DAWSON a Anna SALVATI, 2012. Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano* [online]. 2012, roč. 6, č. 7, s. 5845–5857.

LIU, Dan, Bingqian LIN, Wei SHAO, Zhi ZHU, Tianhai JI a Chaoyong YANG, 2014. In Vitro and in Vivo Studies on the Transport of PEGylated Silica Nanoparticles across the Blood–Brain Barrier. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2014, roč. 6, č. 3, s. 2131–2136.

LUNDQVIST, M., J. STIGLER, G. ELIA, I. LYNCH, T. CEDERVALL a K. A. DAWSON, 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, roč. 105, č. 38, s. 14265–14270.

LUNDQVIST, Martin, Cecilia AUGUSTSSON, Malin LILJA, Kristoffer LUNDKVIST, Björn DAHLBÄCK, Sara LINSE a Tommy CEDERVALL, 2017. The nanoparticle protein corona formed in human blood or human blood fractions. *PLOS ONE* [online]. 2017, roč. 12, č. 4, s. e0175871.

LUNDQVIST, Martin, Johannes STIGLER, Tommy CEDERVALL, Tord BERGGÅRD, Michelle B. FLANAGAN, Iseult LYNCH, Giuliano ELIA a Kenneth DAWSON, 2011. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* [online]. 2011, roč. 5, č. 9, s. 7503–7509.

MA, Xiaowei, Yanyang WU, Shubin JIN, Yuan TIAN, Xiaoning ZHANG, Yuliang ZHAO, Li YU a Xing-Jie LIANG, 2011. Gold Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Size-Dependent Nanoparticle Uptake and Lysosome Impairment. *ACS Nano* [online]. 2011, roč. 5, č. 11, s. 8629–8639.

MARTEL, Jan, David YOUNG, Andrew YOUNG, Cheng-Yeu WU, Chi-De CHEN, Jau-Song YU a John D. YOUNG, 2011. Comprehensive proteomic analysis of mineral nanoparticles derived from human body fluids and analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* [online]. 2011, roč. 418, č. 1, s. 111–125.

MICHAEL DANIELSEN, E. a Gert H. HANSEN, 2016. Small molecule pinocytosis and clathrin-dependent endocytosis at the intestinal brush border: Two separate pathways into the enterocyte. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2016, roč. 1858, č. 2, s. 233–243.

MILANI, Silvia, Francesca BALDELLI BOMBELLI, Andrzej S. PITEK, Kenneth A. DAWSON a Joachim RÄDLER, 2012. Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *ACS Nano* [online]. 2012, roč. 6, č. 3, s. 2532–2541.

MIRONAVA, Tatsiana, Michael HADJIARGYROU, Marcia SIMON, Vladimir JURUKOVSKI a Miriam H. RAFAILOVICH, 2010. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* [online]. 2010, roč. 4, č. 1, s. 120–137.

MIRSHAFIEE, Vahid, Raehyun KIM, Soyun PARK, Morteza MAHMOUDI a Mary L. KRAFT, 2016. Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake. *Biomaterials* [online]. 2016, roč. 75, s. 295–304.

MO, Jianbin, Lizhen HE, Bin MA a Tianfeng CHEN, 2016. Tailoring Particle Size of Mesoporous Silica Nanosystem To Antagonize Glioblastoma and Overcome Blood–Brain Barrier. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, roč. 8, č. 11, s. 6811–6825.

MORAIS, Tiago, Maria Elisa SOARES, José Alberto DUARTE, Leonor SOARES, Sílvia MAIA, Paula GOMES, Eulália PEREIRA, Sónia FRAGA, Helena CARMO a Maria De Lourdes BASTOS, 2012. Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2012, roč. 80, č. 1, s. 185–193.

NANJAPPA, Vishalakshi, Joji Kurian THOMAS, Arivusudar MARIMUTHU, Babyalakshmi

MUTHUSAMY, Aneesha RADHAKRISHNAN, Rakesh SHARMA, Aafaque AHMAD KHAN, Lavanya BALAKRISHNAN, Nandini A. SAHASRABUDDHE, Satwant KUMAR, Binit Nitinbhai JHAVERI, Kaushal Vinaykumar SHETH, Ramesh KUMAR KHATANA, Patrick G. SHAW, Srinivas Manda SRIKANTH, Premendu P. MATHUR, Subramanian SHANKAR, Dindagur NAGARAJA, Rita CHRISTOPHER, Suresh MATHIVANAN, Rajesh RAJU, Ravi SIRDESHMUKH, Aditi CHATTERJEE, Richard J. SIMPSON, H. C. HARSHA, Akhilesh PANDEY a T. S. Keshava PRASAD, 2014. Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, roč. 42, č. D1, s. D959–D965.

NAPIERSKA, Dorota, Leen C. J. THOMASSEN, Virginie RABOLLI, Dominique LISON, Laetitia GONZALEZ, Micheline KIRSCH-VOLDERS, Johan A. MARTENS a Peter H. HOET, 2009. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. *Small* [online]. 2009, roč. 5, č. 7, s. 846–853.

NAWROCKI, Grzegorz a Marek CIEPLAK, 2013. Amino acids and proteins at ZnO–water interfaces in molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2013, roč. 15, č. 32, s. 13628.

NG, Cheng Teng, Florence Mei Ai TANG, Jasmine Jia'en LI, Cynthia ONG, Lanry Lin Yue YUNG a Boon Huat BAY, 2015. Clathrin-Mediated Endocytosis of Gold Nanoparticles In Vitro. *The Anatomical Record* [online]. 2015, roč. 298, č. 2, s. 418–427.

NKANSAH, Paul Okwabi, 2013. *IN VITRO AND IN VIVO TESTING OF ULTRA-SMALL GOLD NANOPARTICLES AS A NOVEL DRUG DELIVERY PLATFORM FOR ENHANCING THE BRAIN PENETRATION AND RECEPTOR BINDING AFFINITY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DRUGS*. B.m. University of Michigan.

NOH, Hyeran a Erwin A. VOGLER, 2006. Volumetric interpretation of protein adsorption: Mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *Biomaterials* [online]. 2006, roč. 27, č. 34, s. 5801–5812.

ORLANDO, Tomas, Alessandro PAOLINI, Francesco PINEIDER, Emanuela CLEMENTI, Francesca PASI, Yannick GUARI, Joulia LARIONOVA, Luciano SACCHI, Rosanna NANO, Maurizio CORTI a Alessandro LASCIALFARI, 2014. NMR as Evaluation Strategy for Cellular Uptake of Nanoparticles. *Nano Letters* [online]. 2014, roč. 14, č. 7, s. 3959–3965.

PAN, Yu, Sabine NEUSS, Annika LEIFERT, Monika FISCHLER, Fei WEN, Ulrich SIMON, Günter SCHMID, Wolfgang BRANDAU a Willi JAHNEN-DECHENT, 2007. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* [online]. 2007, roč. 3, č. 11, s. 1941–1949.

PARK, Jaesook, Arnold ESTRADA, Jon A SCHWARTZ, Parmeswaran DIAGARADJANE, Sunil KRISHNAN, Andrew K DUNN a James W TUNNELL, 2010. Intra-organ biodistribution of gold nanoparticles using intrinsic two-photon-induced photoluminescence. *Lasers in Surgery and Medicine* [online]. 2010, roč. 42, č. 7, s. 630–639.

PARK, Joo-Hee, Hyejoong JEONG, Jinkee HONG, Minwook CHANG, Martha KIM, Roy S. CHUCK, Jimmy K. LEE a Choul-Yong PARK, 2016. The Effect of Silica Nanoparticles on Human Corneal Epithelial Cells. *Scientific Reports* [online]. 2016, roč. 6, č. 1, s. 37762.

PISANI, Cédric, Estelle RASCOL, Christophe DORANDEU, Jean-Charles GAILLARD, Clarence CHARNAY, Yannick GUARI, Joël CHOPINEAU, Jean ARMENGAUD, Jean-Marie DEVOISSELLE a Odette PRAT, 2017. The species origin of the serum in the culture medium influences the in vitro toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells. *PLOS ONE* [online]. 2017, roč. 12, č. 8, s. e0182906.

RAUSCHER, Hubert, Birgit SOKULL-KLÜTTGEN a Hermann STAMM, 2012. The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology* [online]. 2012, roč. 7, č. 7, s. 1195–1197.

REN, Lihua, Jin ZHANG, Yang ZOU, Lianshuang ZHANG, Jialiu WEI, Zhixiong SHI, Yanbo LI, Caixia GUO, Zhiwei SUN a Xianqing ZHOU, 2016. Silica nanoparticles induce reversible damage of spermatogenic cells via RIPK1 signal pathways in C57 mice. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016, roč. 11, s. 2251–2264.

- RICHARDS, David M. a Robert G. ENDRES, 2014. The Mechanism of Phagocytosis: Two Stages of Engulfment. *Biophysical Journal* [online]. 2014, roč. 107, č. 7, s. 1542–1553.
- RITZ, Sandra, Susanne SCHÖTTLER, Niklas KOTMAN, Grit BAIER, Anna MUSYANOVYCH, Jörg KUHAREV, Katharina LANDFESTER, Hansjörg SCHILD, Olaf JAHN, Stefan TENZER a Volker MAILÄNDER, 2015. Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. *Biomacromolecules* [online]. 2015, roč. 16, č. 4, s. 1311–1321.
- \*RIVOLTA, Ilaria, PANARITI a MISEROCCHI, 2012. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications* [online]. 2012, č. September, s. 87.
- ROACH, Paul, David FARRAR a Carole C. PERRY, 2005. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2005, roč. 127, č. 22, s. 8168–8173.
- RUNA, Sabiha, Melike LAKADAMYALI, Melissa L. KEMP a Christine K. PAYNE, 2017. TiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Induced Oxidation of the Plasma Membrane: Importance of the Protein Corona. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2017, roč. 121, č. 37, s. 8619–8625.
- SELA, Hagit, Hagit COHEN, Paz ELIA, Raya ZACH, Zeev KARPAS a Yehuda ZEIRI, 2015. Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2015, roč. 13, č. 1, s. 71.
- SETHURAMAN, Ananthkrishnan, Mina HAN, Ravi S. KANE a Georges BELFORT, 2004. Effect of Surface Wettability on the Adhesion of Proteins. *Langmuir* [online]. 2004, roč. 20, č. 18, s. 7779–7788.
- SHUKLA, Ravi, Vipul BANSAL, Minakshi CHAUDHARY, Atanu BASU, Ramesh R. BHONDE a Murali SASTRY, 2005. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* [online]. 2005, roč. 21, č. 23, s. 10644–10654.
- SIGAL, George B, Milan MRKSICH a George M. WHITESIDES, 1998. Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1998, roč. 120, č. 14, s. 3464–3473.
- SONG, Yang, Dan DU, Lei LI, Jun XU, Prashanta DUTTA a Yuehe LIN, 2017. In Vitro Study of Receptor-Mediated Silica Nanoparticles Delivery across Blood–Brain Barrier. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2017, roč. 9, č. 24, s. 20410–20416.
- SUN, Jiadong, Yajing LIU, Min GE, Guoqiang ZHOU, Wentong SUN, Dandan LIU, Xing Jie LIANG a Jinchao ZHANG, 2017. A Distinct Endocytic Mechanism of Functionalized-Silica Nanoparticles in Breast Cancer Stem Cells. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 1–13.
- TENZER, Stefan, Dominic DOCTER, Jörg KUHAREV, Anna MUSYANOVYCH, Verena FETZ, Rouven HECHT, Florian SCHLENK, Dagmar FISCHER, Klytaimnitra KIOUPTSI, Christoph REINHARDT, Katharina LANDFESTER, Hansjörg SCHILD, Michael MASKOS, Shirley K. KNAUER a Roland H. STAUBER, 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology* [online]. 2013, roč. 8, č. 10, s. 772–781.
- TIRUMALAI, Radhakrishna S., King C. CHAN, DaRue A. PRIETO, Haleem J. ISSAQ, Thomas P. CONRADS a Timothy D. VEENSTRA, 2003. Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2003, roč. 2, č. 10, s. 1096–1103.
- VENDAMANI, V. S., Syed HAMAD, V. SAIKIRAN, A. P. PATHAK, S. VENUGOPAL RAO, V. V. RAVI KANTH KUMAR a S. V. S. NAGESWARA RAO, 2015. Synthesis of ultra-small silicon nanoparticles by femtosecond laser ablation of porous silicon. *Journal of Materials Science* [online]. 2015, roč. 50, č. 4, s. 1666–1672.
- VROMAN, L. a A.L. ADAMS, 1969. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surface Science* [online]. 1969, roč. 16, s. 438–446.
- VROMAN, Leo, Ann L ADAMS, Madeleine KLINGS, Gena C. FISCHER, Priscilla C MUNOZ a Regina P



- SOLENSKY, 1977. REACTIONS OF FORMED ELEMENTS OF BLOOD WITH PLASMA PROTEINS AT INTERFACES. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1977, roč. 283, č. 1 The Behavior, s. 65–76.
- WALCZYK, Dorota, Francesca Baldelli BOMBELLI, Marco P MONOPOLI, Iseult LYNCH a Kenneth A DAWSON, 2010. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2010, roč. 132, č. 16, s. 5761–5768.
- WANG, Ailin, Y. Randika PERERA, Mackenzie B. DAVIDSON a Nicholas C. FITZKEE, 2016a. Electrostatic Interactions and Protein Competition Reveal a Dynamic Surface in Gold Nanoparticle–Protein Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2016, roč. 120, č. 42, s. 24231–24239.
- WANG, Haixia, Li SHANG, Pauline MAFFRE, Siegfried HOHMANN, Frank KIRSCHHÖFER, Gerald BRENNER-WEISS a Gerd Ulrich NIENHAUS, 2016b. The Nature of a Hard Protein Corona Forming on Quantum Dots Exposed to Human Blood Serum. *Small* [online]. 2016, roč. 12, č. 42, s. 5836–5844.
- WHO, 2017. *WHO guidelines on protecting workers from potential risks of manufactured nanomaterials*. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO [online]. 2017.
- WOODS, Karen E., Y. Randika PERERA, Mackenzie B. DAVIDSON, Chloe A. WILKS, Dinesh K. YADAV a Nicholas C FITZKEE, 2016. Understanding Protein Structure Deformation on the Surface of Gold Nanoparticles of Varying Size. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2016, roč. 120, č. 49, s. 27944–27953.
- XIN LIU a Jiao SUN, 2010. Silica nanoparticles induce apoptosis in human endothelial cells via reactive oxygen species. V: *2010 3rd International Nanoelectronics Conference (INEC)* [online]. B.m.: IEEE, s. 824–825. Dostupné na: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5425186/>
- XU, Li-Chong a Christopher A. SIEDLECKI, 2007. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* [online]. 2007, roč. 28, č. 22, s. 3273–3283.
- \*YAMEEN, Basit, Won Il CHOI, Cristian VILOS, Archana SWAMI, Jinjun SHI a Omid C FAROKHZAD, 2014. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, roč. 190, s. 485–499.
- YANG, Lin, Huijuan KUANG, Wanyi ZHANG, Zoraida P. AGUILAR, Hua WEI a Hengyi XU, 2017. Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 3303.
- YE, Dong, Mattia BRAMINI, Delyan R. HRISTOV, Sha WAN, Anna SALVATI, Christoffer ÅBERG a Kenneth A. DAWSON, 2017. Low uptake of silica nanoparticles in Caco-2 intestinal epithelial barriers. *Beilstein Journal of Nanotechnology* [online]. 2017, roč. 8, č. 1, s. 1396–1406.
- YU, Meihua, Siddharth JAMBHRUNKAR, Peter THORN, Jiezhong CHEN, Wenyi GU a Chengzhong YU, 2013a. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale* [online]. 2013, roč. 5, č. 1, s. 178–183.
- YU, Meihua, Surajit KARMAKAR, Jie YANG, Hongwei ZHANG, Yannan YANG, Peter THORN a Chengzhong YU, 2014. Facile synthesis of ultra-small hybrid silica spheres for enhanced penetration in 3D glioma spheroids. *Chem. Commun.* [online]. 2014, roč. 50, č. 13, s. 1527–1529.
- YU, Meng, Bo LEI, Chuanbo GAO, Jin YAN a Peter X. MA, 2017. Optimizing surface-engineered ultra-small gold nanoparticles for highly efficient miRNA delivery to enhance osteogenic differentiation of bone mesenchymal stromal cells. *Nano Research* [online]. 2017, roč. 10, č. 1, s. 49–63.
- YU, Yang, Yang LI, Wen WANG, Minghua JIN, Zhongjun DU, Yanbo LI, Junchao DUAN, Yongbo YU a Zhiwei SUN, 2013b. Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 4, s. e61346.
- ZAKHIDOV, S. T., V. M. RUDOY, O. V. DEMENT'EVA, N. M. MUDZHIRI, N. V. MAKAROVA, I. A. ZELENINA, L. E. ANDREEVA a T. L. MARSHAK, 2015. Effect of ultrasmall gold nanoparticles on the murine native sperm chromatin. *Biology Bulletin* [online]. 2015, roč. 42, č. 6, s. 479–485.

ZENG, Zhiyang, Jiten PATEL, Shih-Hui LEE, Monica MCCALLUM, Anuradha TYAGI, Mingdi YAN a Kenneth J. SHEA, 2012. Synthetic Polymer Nanoparticle–Polysaccharide Interactions: A Systematic Study. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2012, roč. 134, č. 5, s. 2681–2690.

ZHANG, Hui, Alvin Y. LIU, Paul LORIAUX, Bernd WOLLSCHIED, Yong ZHOU, Julian D. WATTS a Ruedi AEBERSOLD, 2007. Mass Spectrometric Detection of Tissue Proteins in Plasma. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2007, roč. 6, č. 1, s. 64–71.

ZHANG, Weimin, Wuren MA, Jing ZHANG, Xiaoping SONG, Wenjing SUN a Yunpeng FAN, 2017. The immunoregulatory activities of astragalus polysaccharide liposome on macrophages and dendritic cells. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, roč. 105, s. 852–861.

ZHU, Jie, Lei LIAO, Lina ZHU, Peng ZHANG, Kai GUO, Jilie KONG, Chang JI a Baohong LIU, 2013. Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells. *Talanta* [online]. 2013, roč. 107, s. 408–415.

### **Internetové zdroje:**

ISO/TS 80004-2:2015 (en) 2015, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects, online dostupné z: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-2:ed-1:v1:en>

ISO/TS 80004-1:2015(en) 2015, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms, online dostupné z: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en:term:2.6>