

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Využití nanomateriálů v léčivech, léčbě rakoviny a tkáňovém inženýrství

Pavla Janková

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavla Janková**  
Osobní číslo: **C15644**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Využití nanomateriálů v léčivech, léčbě rakoviny a tkáňovém inženýrství**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

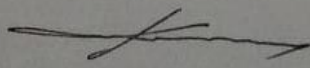
1. Literární rešerše zaměřená na využití nanomateriálů v léčivech
2. Literární rešerše zaměřená na využití nanomateriálů při léčbě rakoviny
3. Literární rešerše zaměřená na využití nanočástic v tkáňovém inženýrství

Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Rozsah pracovní zprávy: 25 s.  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:

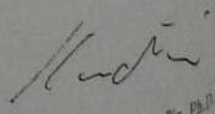
Vedoucí bakalářské práce: Ing. Marek Bouška, Ph.D.  
Katedra polygrafie a fotofyziky

Datum zadání bakalářské práce: 21. prosince 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 4. července 2019

  
prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2019

## Prohlášení autora

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

.....  
Pavla Janková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Marku Bouškovi, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a ochotu. Děkuji také mojí rodině za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá využitím nanotechnologií a nanočástic v medicíně aplikacích. V úvodní části je jsou uvedeny vlastnosti a konkrétní modely nanočástic, které by mohly být využity jako nosiče léků. V práci je uvedeno, jak by tyto modely konkrétně mohly fungovat ať už při léčbě rakoviny nebo jiných závažných či méně závažných onemocnění. Stěžejní kapitoly jsou věnovány právě léčbě rakoviny pomocí nanočástic a jejich využití v radioterapii. Závěr práce předkládá informace o metodách syntézy nanovláken a jejich následné využití v tkáňovém inženýrství.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Nanotechnologie, nanočástice, nosiče léků, chemoterapie, rakovina, radioterapie, tkáňové inženýrství

## **TITLE**

Using nanomaterials in pharmaceuticals, cancer therapy and tissue engineering

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the use of nanotechnologies and nanoparticles in medical applications. In the introductory part are presented properties and specific models of nanoparticles that could be used as pharmaceutical carriers. The thesis describes how these models could work specifically for cancer therapy or other severe or less severe diseases. The main chapters are devoted exactly to the cancer therapy using of nanoparticles and use nanoparticles in radiotherapy. In conclusion of this thesis presents information on methods of nanofiber synthesis and their subsequent use in tissue engineering.

## **KEYWORDS**

Nanotechnology, nanoparticles, pharmaceutical carriers, chemotherapy, cancer, radiotherapy, tissue engineering

# OBSAH

<b>0 ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>1 NANOMATERIÁLY JAKO NOSIČE LÉKŮ.....</b>	<b>11</b>
1.1 TRANSPORT LÉKŮ.....	11
1.2 SOUVISEJÍCÍ VÝZKUM A JEHO DOPAD .....	12
1.3 LIPOSOMY .....	13
1.4 NANOPÓRY .....	15
1.5 NANOSKOŘÁPKY .....	15
1.6 DODÁVÁNÍ BÍLKOVIN A PEPTIDŮ.....	16
1.7 APLIKACE A PROBÍHAJÍCÍ VÝZKUMNÉ STUDIE .....	16
1.8 ODOLNOST PROTI ANTIBIOTIKŮM .....	17
1.9 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ .....	17
<b>2 CHEMOTERAPIE A LÉČBA RAKOVINY POMOCÍ NANOČÁSTIC .....</b>	<b>18</b>
2.1 DŮLEŽITÉ VLASTNOSTI NANOČÁSTIC.....	18
2.2 NANO-STRUKTUROVANÉ POLYMERNÍ TOBOLKY .....	19
2.3 DENDRIMERY .....	20
2.4 NANOBUŇKY .....	20
2.5 SPECIÁLNÍ VYUŽITÍ NANOČÁSTIC .....	21
2.6 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE .....	22
<b>3 RADIONANOMEDICÍNA.....</b>	<b>23</b>
3.1 BEZPEČNOSTNÍ ASPEKTY PŘI VYUŽÍVÁNÍ NANOMATERIÁLU V MEDICÍNĚ.....	23
3.2 MONITOROVÁNÍ NANOČÁSTIC IN VIVO ZA ÚČELEM USNADNĚNÍ KLINICKÝCH STUDIÍ.....	23
3.3 MODIFIKACE STRATEGIE PRO KLINICKOU APLIKACI.....	24
3.4 PROBLÉMY CHOVÁNÍ IN VIVO VYŠETŘOVANÉ RADIONANOMEDICÍNOU .....	25
3.5 RADIONANOMEDICÍNA ENDOGENNÍCH NANOČÁSTIC .....	27
<b>4 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ .....</b>	<b>29</b>
4.1 BIOMATERIÁLY .....	29
4.2 METODY SYNTÉZY NANOVLÁKEN .....	29
4.2.1 <i>Elektrospinning</i> .....	30
4.2.2 <i>Samosestavování</i> .....	32
4.2.3 <i>Separace fází</i> .....	33
4.3 NANOVLÁKNA V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ KOSTERNÍ SVALOVINY.....	34
4.4 NANOVLÁKNA PRO KOŽNÍ TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ .....	35
4.5 NANOVLÁKNA PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ KREVNÍCH CÉV .....	35
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>37</b>
<b>6 POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>39</b>

## **SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK**

Obrázek 1: Modely nanočástic využívané pro transport léčiv

Obrázek 2: Cytostatikum doxorubicin enkapsulovaný v liposomu

Obrázek 3: Schematické znázornění, jak mohou být nanočástice použity k léčbě rakoviny.

Obrázek 4: Schematické znázornění nanostrukturované kapsle. Nanočástice zlata absorbující světlo jsou uloženy v polyelektrolytových vrstvách (A). Krátký laserový puls zahřívá nanočástice zlata, které nabobtnají a způsobují prasknutí kapsle (B).

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

STM	Skenovací tunelový mikroskop
AFM	Mikroskopu atomových sil
MRI	Magnetická rezonance
ADEPT	Protilátková cílená enzymová proléková terapie
NIR	Blízké infračervené záření
IgG	Imunoglobulin G
PEG	Polyethylenglykol
ROS	Reaktivní kyslík
PET	Pozitronová emisní tomografie
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie
CVD	Chemická depozice z plynné fáze
PLA	Polykyselina mléčná
PU	Polyurethan
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PLGA	Polykyselina mléčná-koglykolová
PEVA	Polyethylen-ko-vinylacetát
PLLA-CL	Poly-L-laktid-co-ε-kaprolakton
ECM	Extracelulární matrix
PEU	Polyester urethanu
PU	Polyutethan



## 0 Úvod

Pojem nanotechnologie se v posledních letech stává čím dál více skloňovaným termínem ve spoustě vědních oborů, technice, ale také mezi širokou veřejností. Pojem „nano“ vyjadřuje násobek – jedna miliardtina, tedy  $10^{-9}$ . Do relativně nového pojmu nanotechnologie pak můžeme zahrnout veškeré struktury a techniky, které odpovídají jedné miliardtině metru a zároveň se tak nachází na atomární a molekulární úrovni. Protože celý svět kolem nás je složen z atomů a molekul, byl zavedený pojem nanotechnologie příliš široký a musel být tedy ohraničen několika podmínkami. První z nich udává rozměr a vnitřní strukturu materiálů a systémů, která se musí pohybovat v rozmezí 1–100 nm. Další podmínkou je využití fyzikálních a chemických vlastností na úrovni atomů a molekul, které jsou neobvyklé v porovnání se stejným materiálem, který nemá nanosložky. A nakonec by měly být kombinovatelné tak, aby vytvářily velké struktury, které budou mít přesah do makrosvěta. [1,3,5,10]

V klasické terminologii na úrovni mikrosvěta se vymezují samostatné molekuly a atomy. K tomuto vymezení slouží spodní rozměrová hranice, kterou je 1 nm. Přesto můžeme označit za nanotechnologie i takové aktivity a materiály, které nemají velikost nano, ale strukturně tuto definici splňují. Pokud vytváříme nanomateriály z větších rozměrů jako jsou metry nebo milimetry, potom takovéto postupy nazýváme Top down. Pokud naopak dochází k tvorbě složitějších a větších struktur z menších prvků, nazýváme takovéto postupy jako Bottom up. [1,5]

Pokud se podíváme na nanotechnologie z hlediska historie, zjistíme, že některé objevy, které bychom mohli zařadit mezi nanotechnologie, jsou známy již z dob dávnověku. Ve 4. století našeho letopočtu bylo zaznamenáno využití technologie, kterou bychom dnes mohli označit za nanotechnologii, při výrobě poháru ze sodnovápenatého skla. Toto sklo obsahovalo nanočástice zlata a stříbra, které následně způsobily zbarvení od zelené až po tmavě červenou barvu. Změna barvy odpovídá úhlu dopadajícího světla. Dalším typickým důkazem je Brownův pohyb, který je možné pozorovat na pohybu drobných částic ve vakuolách pylových zrn. Jeho předchůdcem byl Jan Ingenhouszen, který pozoroval částice prachu pohybující se na hladině alkoholu. V průběhu 19. a 20. století došlo k velkému rozmachu v řadě vědních oborů. V této době už bylo možné označit zkoumané jevy a technologie za nanotechnologie. Za zakladatele myšlenky nanotechnologií je považován americký fyzik a nositel Nobelovy ceny Richard Feynman. Ten ve své přednášce z 29. 12.

1959 předpověděl možnost vytvoření mechanismů a materiálů na úrovni atomů a molekul, které si umí příroda vytvářet a také je využívat. Dále předpověděl, že k naplnění jeho slov dojde až s rozvojem experimentální techniky, která zvládne s „nano“ objekty manipulovat a měřit jejich vlastnosti. Po roce 1960 došlo k postupnému vývoji metod k přípravě nanočástic a metod fotolitografických. Nicméně nejzásadnějším zlomem v charakterizaci nanomateriálů se stal objev STM a následně vynález AFM, který umožnily sledování a měření dějů až na úrovni atomů. Od těchto zlomů dochází k čím dál většímu nárůstu objevů a patentů, včetně praktického použití nanotechnologií ve všech vědních oborech. Největší výhodou nanočástic je tedy práce na úrovni atomů a molekul, které však mají důsledky do makrosvěta. Jednotlivé revoluční objevy lze ohraničit dobou zhruba 75 let. Za prvních 25 let došlo k položení základů techniky, které bylo doprovázeno vydáváním publikací, patentů nebo výrobou nových nanoproductů. Následujících 50 let docházelo ke zdokonalování a šíření příslušných technologií. [1,6,10]

Nanotechnologie tedy pracují na principu použití především zmenšených zařízení. Dokáží ale také měnit vlastnosti a funkce oproti stejnému makroskopickému materiálu. Díky těmto všem výjimečným vlastnostem jsou nanotechnologie a nanomateriály čím dál více využívány v oblasti biologie, a především v oblasti medicíny. Následující kapitoly této práce budou věnovány vybraným aplikacím nanočástic a nanomateriálů v medicíně. [1,5]

# 1 Nanomateriály jako nosiče léků

Medicína je pole neustálých nových nápadů a vynálezů. Stejně tak nanotechnologie jako nový vědní obor. V posledních několika letech nanotechnologie stále více zasahují do vývoje nových medicínálních postupů i materiálů. Pomocí nanomateriálů můžeme diagnostikovat onemocnění a následně toto onemocnění nanolékem vyléčit. Výhodou nanoléků je podobná velikost s většinou biologických molekul a struktur, na něž chceme nanolékem působit. Proto mohou být nanomateriály užitečné jak pro in vivo, tak pro in vitro biomedicínský výzkum a aplikace. Využití léků na úrovni nano například pomáhá aktivovat antigeny, které pak mohou snadněji pracovat proti protilátkám. Dochází tak k jejich potlačení a úplnému zničení. [3,5]

Základní body použití léku jsou založeny na třech skutečnostech: a) účinné zapouzdření léků, aby nedošlo k jeho znehodnocení během transportu do cílového místa účinku, b) úspěšné dodání uvedených léčiv do cílové oblasti těla a c) úspěšné uvolňování tohoto léčiva v požadovaném místě účinku. [3]

## 1.1 Transport léků

Nanotechnologie poskytly možnost dodávat léky specifickým buňkám za použití nanočástic. Celková spotřeba léku a jeho vedlejší účinky mohou být významně sníženy tím, že dojde k doručení účinné látky pouze do postižené oblasti a v optimální dávce. Cílený nebo personalizovaný lék je určen právě ke snížení spotřeby léků a nákladů na léčbu, což vede k výraznému snížení nákladů a tím k celkovému společenskému prospěchu v systému veřejného zdravotnictví. [3,5]

Nanomedicínské přístupy pro poskytování léků a vývoj částic nebo molekul se neustále posouvají dopředu a tím dochází také ke zlepšení dostupnosti těchto léků. Biologická dostupnost znamená přítomnost molekul léčiv na místech v těle, kde jsou potřebné a kde budou mít co nejlepší a nejpřesnější účinek. Transport léků se zaměřuje na maximalizaci biologické dostupnosti nejen na konkrétní místo v těle, ale i na maximalizaci účinku po určitou dobu. Toho lze potenciálně dosáhnout pomocí molekulárně cílených zařízení, která pracují na principu nanoinženýrství. Jedná se pak o cílení aktivních molekul s přesností na jednotlivé buňky. [3,5]

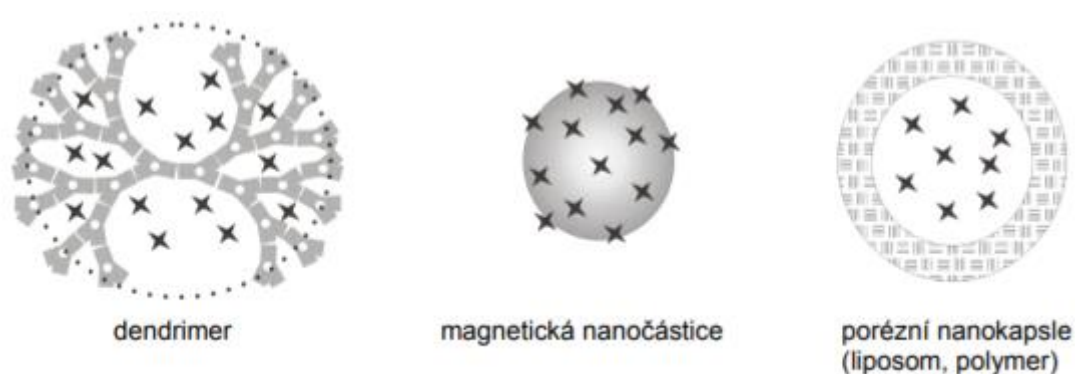
Zobrazování in vivo je další oblastí, kde dochází k vývoji nejrůznějších nástrojů a přístrojů. Pomocí kontrastních činidel, která obsahují nanočástice, mají obrazy, získané pomocí ultrazvuku a MRI, mnohem lepší rozlišení a kontrast. Nové metody výroby a přípravy nanotechnologických materiálů, které se vyvíjejí, mohou být účinné při léčbě širokého spektra

onemocnění včetně rakoviny. Dalšího zdokonalování přístrojů by mohlo být dosaženo vlastním sestavováním biokompatibilních nanozařízení, která by mohla automaticky detekovat, vyhodnocovat, léčit a hlásit výsledky klinickému lékaři. [3,5]

## 1.2 Související výzkum a jeho dopad

Je zřejmé, že nanočástice jsou slibné nástroje pro rozvoj podávání léků a pro lékařské zobrazování pomocí diagnostických senzorů. Biodistribuce těchto nanočástic je však stále nedokonalá kvůli potížím s reakcí hostitele na nano- a mikroskopické materiály zaměřené na specifické orgány v těle. Nicméně stále probíhá řada výzkumných projektů s cílem lépe pochopit potenciál a omezit nepříznivé vlastnosti nanočásticových systémů. [3,5,6]

Příklad lze nalézt u dendrimerů, magnetické nanočástice a nanoporézních materiálů. Viz obrázek č. 1. Jiným příkladem je použití blokových kopolymerů, které tvoří micely pro zapouzdření léčiva. Ty by mohly udržet malé molekuly léku bez poškození a dopravit je na požadované místo účinku. Další vize vychází z malých elektromechanických systémů. Nanoelektromechanické systémy jsou zkoumány pro aktivní uvolňování léků.[3,5,8]



**Obrázek č. 1: Modely nanočástic využívané pro transport léčiv**

Převzato z: [8]

Některé potenciálně důležité aplikace zahrnují léčbu rakoviny nanočásticemi železa nebo tzv. zlatými „skořápkami“. Současný výzkum, který probíhá na myších, ukazuje schopnost kompozitů zlata se selektivně zaměřovat na určité orgány na základě jejich velikosti a náboje. Tyto kompozity jsou zapouzdřeny v dendrimeru a jsou jim přiřazeny specifické náboje a velikosti. Bylo zjištěno, že pozitivně nabitě nanočástice zlata vstupují do ledvin, zatímco negativně nabitě zlaté nanočástice zůstávají v játrech a slezině. Předpokládá

se, že kladný povrchový náboj nanočástic snižuje rychlost opsonizace nanočástic v játrech, a tím ovlivňuje vylučovací rychlost. Dokonce i při poměrně malém rozměru (5 nm) se tyto částice mohou rozdělit do periferních tkání a tím se v průběhu času akumulovat. Výzkum těchto materiálu dokazuje, že pro cílení a distribuci mohou být nanočástice použitelnou alternativou k běžným lékům, je však důležité neopomíjet nebezpečí nanotoxicity. [3,6]

Jsou také vyvíjeny nanočástice, které jsou vhodné jako antivirotika. Nanočástice při této aplikaci nepůsobí na molekuly virů, ale transportují enzym, který zabraňuje tvorbě molekul virů v krevním oběhu pacienta. Jiné práce se zaměřují na přípravu nanočástic, které mohou dodávat léky do konkrétní části mozku a řešit tím neurologické poruchy. Dochází též k vývoji metody pro zvýšení imunitní odpovědi, generované vakcínami, připojením molekul vakcíny k nanostruktúře DNA, která dodává molekuly vakcíny specifickým buňkám a ty jsou klíčem k vyvolání imunitní odpovědi bílých krvinek. [3]

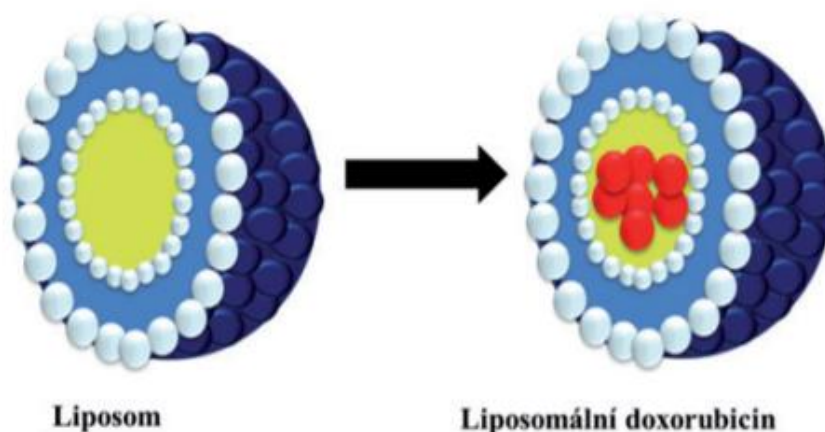
### 1.3 Liposomy

Liposomy objevené v polovině šedesátých let byly označovány za původní modely zařízení pro dodávání nanoúrovňových léčiv.

Jedná se o sférické nanočástice vyrobené z lipidů dvouvrstvé membrány s vnitřním vodným prostředím. Mohou být unilamelární s jednou lamelou membrány nebo multilamelární s více membránami a mohou být použity jako účinné systémy pro dodávání léčiv. Rakovinové chemoterapeutické léky, jiné toxické látky a léky jako například amfotericin a hamycin, poskytují mnohem lepší účinnost a bezpečnost, ve srovnání s běžnými přípravky, pokud se používají právě jako liposomální léčiva. Tyto liposomy mohou nést léky buď uvnitř struktury, nebo v lipidové membráně. Léčivý rozpustnými ve vodě jsou obvykle naplněna vnitřní prostředí liposomů a léčiva rozpustná v lipidech jsou zakomponována v liposomální membráně. [5,6]

Hlavní nevýhodou liposomu je jeho rychlá degradace a clearance (= vztažená k určité látce; množství plazmy, které se očistí od této látky za jednotku času) způsobená jaterními makrofágy, čímž se zkracuje doba trvání působení léku, který nese. To lze do jisté míry eliminovat použitím stealth liposomů (= liposomy, které mají PEG na své vnější membráně). Stealth liposomy jsou liposomy potaženy materiály jako je např. polyoxyetylen, který zabraňuje opsonizaci liposomů a jejich vylučování makrofágy. Další způsob prodloužení doby cirkulace liposomů je začlenění látek jako jsou cholesterol, polyvinylpyrrolidon, polyakrylamidové lipidy a vysokoteplotní fosfolipidy distearoyl fosfatidylcholin. [5,6]

Pokud bychom se podívali na cílení liposomů, tak liposomy mohou být cíleny na specifické orgány nebo tkáně jak pasivními tak i aktivními metodami. Působení liposomálních léků na okolní tkáně je z bezpečnostního hlediska lepší, než působení neliposomálního léčiva. Cévnatost v nádoru tkáně je špatně organizována a dochází tak k významnému úniku z krevní cévy v nádorové tkáni. Liposomální léky se pasivně nahromadí v nádorové tkáni a dochází k jejich zvýšenému uvolňování. Aktivního cílení léčiva může být dosaženo použitím imunoliposomů a ligandů řízenými liposomy. Imunoliposomy jsou liposomy konjugované s protilátkou namířenu proti nádorovému antigenu. Protilátka může být konjugována s povrchem stealth liposomu, polyoxyethylenovým povlakem stealth liposomu nebo na povrchu liposomu, který není stealth. Tyto imunoliposomy při injekci do těla dosáhnou cílové tkáně a nashromáždí se uvnitř. Tím se snižují nežádoucí účinky a také se zvýší dodávání léčiva do cílové tkáně, tedy se zvýší bezpečnost a účinnost. ADEPT = (Antibody directed enzyme prodrug therapy) se skládá z liposomů konjugovaných s enzymem pro aktivaci proléčiva a z protilátek mířených proti nádorovému antigenu (enzymově vázané imunoliposomy). Ty se podávají před podáním proléčiva. Protilátka směřuje enzym k cílové tkáni, kde dochází k selektivní aktivaci proléčiva a jeho přeměně na svou aktivní formu. Tímto způsobem se aktivace léčiva vyhýbá normálním okolním tkáním, čímž se minimalizuje toxicita léku. Takovéto studie se zkoušejí s epirubicinem a doxorubicinem, který je zobrazen na obrázku č. 2.



**Obrázek č. 2: Cytostatikum doxorubicin enkapsulovaný v liposomu**

Převzato z: [9]

Liposomy nesoucí ligand jsou konjugovány se specifickými ligandy, které jsou zaměřeny na cílové struktury. Například u rakoviny vaječníků dochází k nadměrné expresy folátu nádorových tkání. Liposomální lék tedy může být konjugován s folátem tak, aby působil přímo na molekuly v tumoru. Tato metoda se také používá při léčbě leishmaniózy, kde liposomální hamycin konjugovaný s manosylem albuminu v lidském séru je zaměřen na lidské makrofágy. Obecně bylo zjištěno, že přípravky obsahující cílené liposomy mají vyšší účinnost než přípravky obsahující necílené liposomy. [5,6]

#### 1.4 Nanopóry

Nanopóry navržené v roce 1997 vědci Desai a Ferrari se skládají z tzv. oplatek s vysokou hustotou pórů (průměr 20 nm). [11] Póry umožňují kyslíku, glukóze a jiným látkám, jako je inzulín, prostupovat skrz. Nepovoluje však prostup imunoglobulinů a buněk. Nanopóry lze využít jako zařízení na ochranu transplantovaných tkání před imunitním systémem hostitele a zároveň zužitkovat benefity transplantace. Například B buňky pankreatu mohou být uzavřeny uvnitř nanopórového zařízení a dále implantovány příjemci. Tento vzorek tkáně je pak vyživován z okolních tkání a zároveň chráněn před imunitním systémem a není tudíž odmítnut. Tato metoda by mohla sloužit jako novější způsob léčby diabetu mellitu závislého na inzulinu. [5]

Nanopóry mohou být také použity v DNA sekvenování. Brantonův tým na Harvardově univerzitě pracuje na modifikovaných nanopórech, které mají schopnost diferencovat řetězce DNA na základě rozdílů v sekvencích párů bází. Nanopóry jsou také vyvíjeny se schopností diferencovat puriny z pyrimidinů. Dále začlenění elektricky vodivé elektrody, která je navržena pro zlepšení podélné identifikace párů bází. Takováto metoda by mohla číst tisíce bází za sekundu na pór, čímž by se snížily náklady na vysoce výkonné sekvenování genomu, které by bylo přínosem pro aplikaci farmakogenomiky v procesu vývoje léčiv. [5]

#### 1.5 Nanoskořápky

Nanoskořápky byly vyvinuty vědci West a Halas na Rice University jako nový způsob cílené terapie. Nanoskořápky se skládají z nanočástic s jádrem z oxidu křemičitého a povlakem z tenkého kovového obalu. Ty mohou být zacíleny na požadovanou tkáň pomocí imunologické metody. Tato technologie slouží k vyhodnocení rakovinné terapie. Hirsh a kol. používali vylepšené nanoskořápky, které jsou schopné absorbovat infračervené záření. Zdroj tohoto záření je umístěn mimo tělo, aby se prokázala termo-ablativní vlastnost nanoskořápek. Nanoskořápky při působení záření z oblasti NIR elektromagnetického spektra se zahřívají a způsobují destrukci tkáně. Takhle byly studovány v oblastech jak in vitro, tak in vivo

experimenty s HER2 exprimujícími buňkami lidského karcinomu prsu SK-BR-3. Kontrolní buňky neztratily životaschopnost ani po ošetření nanoskořápkami s nescifickým anti IgG nebo PEG a NIR. [5]

Nanoskořáčky mohou být také vloženy do polymerního hydrogelu obsahující léčivo. Dochází k nasměrování nanočástic do nádorové tkáně imunologickou metodou s infračerveným laserem. Jsou vyrobeny tak, aby se v cílové tkáni zahřály, roztavily polymer a uvolnily léčivo v nádorové tkáni. Cíleným uvolňováním léků se vyvarujeme toxicitě chemoterapeutických léků proti rakovině. Nanoskořáčky jsou v současné době zkoumány na mikro metastazování nádorů a také pro léčbu diabetu. Dále jsou také užitečné pro diagnostické účely v imunoanalýzách krve. Zlaté nanoskořáčky mohou být spojené s protilátkami a velikost může být modulována v závislosti na vlnové délce infračerveného záření, která má schopnost proniknout vzorky plné krve. Díky tomu je možné detekovat imunoglobuliny v koncentračním rozsahu nanogramů na mililitr plazmy a krve.[5]

## 1.6 Dodávání bílkovin a peptidů

Proteiny a peptidy vykazují v lidském těle více biologických účinků a byl prokázán jejich účinek i při léčbě různých onemocnění a poruch. Tyto makromolekuly se nazývají biofarmaka. Cílené nebo řízené dodávání těchto biofarmak pomocí nanomateriálů, jako jsou nanočástice a dendrimery, je nově vznikající odvětví výzkumu nazvané nanobiofarmacie a tyto produkty se nazývají nanobiofarmaka. [3]

## 1.7 Aplikace a probíhající výzkumné studie

Bylo zjištěno, že nanočástice dodávající myelinové antigeny indukují imunitní toleranci u testování myši s relapsy roztroušené sklerózy. Biodegradabilní polystyrénové částice potažené myelinovými pláštěmi peptidů resetují imunitní systém myši a zabraňují opakovanému onemocnění nebo redukcii příznaků. K tomu dochází tak, že zastaví útok imunitního systému na ochranné vrstvy myelinového pláště na nervových vláknech centrálního nervového systému. Tým výzkumníků v Northwestern University ukázal, že tato metoda léčby může být potenciálně použita i u jiných autoimunitních onemocnění. [3]

Výzkumníci z UCLA (University of California, Los Angeles) vyvinuli systém nanočástic s vodou rozpustným obalem a zapouzdřeným proteinem získaným z viru ptačí chudokrevnosti apoptinu. Apoptin selektivně posílá signál "samoregistrace" na nádorové buňky a spouští programovanou buněčnou smrt (apoptózu), přičemž nechává zdravé buňky nepoškozené. U myšičího modelu rakoviny prsu u člověka byla zjištěna léčba, která významně snížila růst nádorů. Tato nová forma léčby se podobá chemoterapii a genové terapii, avšak bez



rizika poškození zdravých buněk a bez pravděpodobnosti genetické mutace, která obvykle doprovází genovou terapii. [3]

### 1.8 Odolnost proti antibiotikům

Nanočástice mohou být použity v kombinované terapii ke snížení odolnosti vůči antibiotikům. Bylo prokázáno, že oxid zinečnatý může snížit odolnost vůči antibiotikům a zvýšit antibakteriální aktivitu ciprofloxacinu proti mikroorganismu in vitro. Nanočástice mohou interferovat s různými proteiny, které interagují s antibiotickou rezistencí nebo farmakologickými mechanismy léků. [3]

### 1.9 Imunitní odpověď

„Buckyballs“ byly zkoumány kvůli schopnosti „přerušit“ alergii nebo imunitní odpověď tím, že zabraňují žírným buňkám (které způsobují alergickou reakci) uvolňovat histamin do krve a tkání vazbou na volné radikály, které působí mnohem lépe, než jakýkoliv antioxidant dostupný v současné době (např. vitamin E). [3]

## 2 Chemoterapie a léčba rakoviny pomocí nanočástic

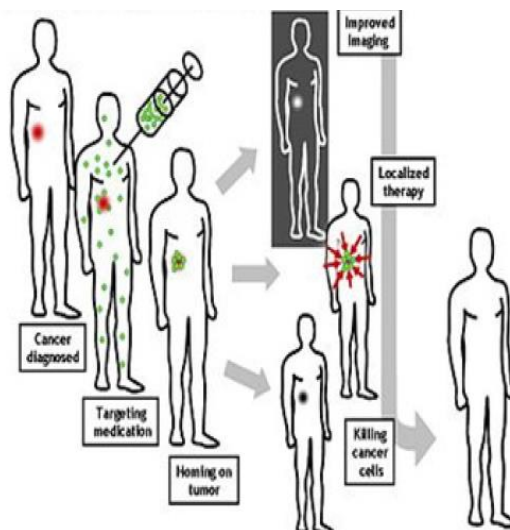
Nanotechnologie využívané při léčbě rakoviny je interdisciplinární oblastí výzkumu ve vědě, strojírenství a medicíně se širokými aplikacemi pro molekulární zobrazování, molekulární diagnostiku a cílenou terapii. Hlavním důvodem využití je, že nanočástice (např. kvantové tečky polovodičů nebo nanokrystaly z oxidů železa) mají optické, magnetické nebo strukturní vlastnosti, které nenalezneme u běžných molekul. Pokud jsou tyto nanočástice spojeny s ligandy působící na nádory (např. monoklonální protilátky, peptidy nebo malé molekuly), mohou být použity k cílení nádorových antigenů (biomarkerů) s vysokou afinitou a specifitou. V rozsahu velikostí o průměru 5-100 nm mají nanočástice také velký povrch a volné funkční skupiny pro konjugaci s více diagnostickými (např. optickými, radioizotopovými nebo magnetickými) a terapeutickými (např. protirakovinnými) činidly. Nedávné pokroky vedly k bioafinitním nanočásticovým sondám, které dokáží zobrazit cílené nanočásticové léky pro léčbu rakoviny, její časnou detekci a screening na molekulové a buněčné úrovni. Tento vývoj vyvolává zajímavé příležitosti pro personalizovanou onkologii, ve které se používají genetické a proteinové biomarkery k diagnostice a léčbě rakoviny na základě molekulárních profilů jednotlivých pacientů. [3,5]

### 2.1 Důležité vlastnosti nanočástic

Kromě již zmiňované malé velikosti, mohou mít nanočástice také vlastnosti, díky kterým mohou být velmi užitečné v onkologii, zejména v zobrazování. Kvantové tečky (nanočástice s kvantově omezenými vlastnostmi, jako je např. dimenzování emisí světla) používané během MRI mohou vytvářet výjimečné obrazy nádorových míst. Tyto nanočástice jsou mnohem více kontrastní než organická barviva a potřebují pouze jeden světelný zdroj pro buzení. To znamená, že použití fluorescenčních kvantových teček má výhodu ve vytvoření kontrastního obrazu s nižšími náklady než v současnosti používaná organická barviva. Nevýhodou však je, že kvantové body jsou obvykle vyrobeny z velmi toxických prvků. [3]

Poměrně vysoký poměr plochy k objemu umožňuje, aby se velké množství funkčních skupin připojilo k nanočásticím, které mohou vyhledat a vázat určité nádorové buňky. Navíc malá velikost nanočástic (10 až 100 nanometrů) jim umožňuje přednostně se hromadit na nádorových místech (obr. 3). Velmi zajímavou výzkumnou otázkou je, jak tyto zobrazovací nanočástice vyvinout v dostatečném množství pro léčbu rakoviny. Například je možné vyrábět multifunkční nanočástice, které by detekovaly, zobrazovaly a následně léčily nádor. Tato otázka je neustále důkladně zkoumána a odpověď by mohla ovlivnit budoucnost léčby

rakoviny. Slibná nová léčba rakoviny, která může jednoho dne nahradit ozařování a chemoterapii, se pomalu, ale jistě blíží testování na lidech. [3]



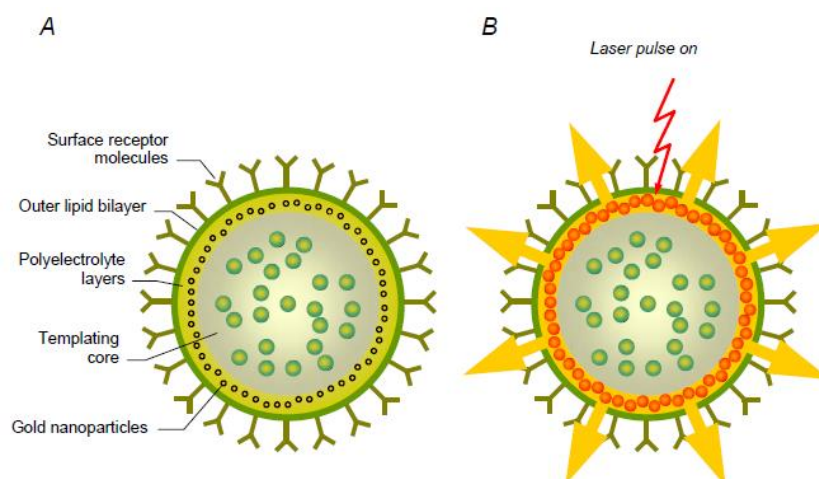
**Obrázek č. 3: Schematické znázornění, jak mohou být nanočástice použity k léčbě rakoviny.**

Převzato z: [3]

## 2.2 Nano-strukturované polymerní tobolky

Právě nano-strukturované polymerní tobolky by mohly být použity k dodávání léků v podobě chemoterapie přímo do nádorů, přičemž by zůstávaly sousední tkáň neporušené. Koncept kapsle v podstatě tvoří templovací jádro (přibližně 1  $\mu\text{m}$  v průměru), které obsahuje částice léčiva. Tyto částice jsou obklopené vícevrstevnými polymerními kuličkami obsahující nanočástice zlata, které jsou schopny absorbovat záření o vhodné vlnové délce (přibližně 6 nm v průměru). Tento celek tvoří tzv. vnitřní vrstvu. Lipidová dvojvrstva a nádorově specifické protilátky tvoří vnější vrstvu. Při injekci do krevního oběhu se nanostrukturované kapsle soustřeďují uvnitř nádorů. Když se v maligních buňkách shromáždí dostatečný počet kapslí, použije se nízkoenergetický puls infračerveného laseru. Např. desetinanosekundový laserový puls je dostatečně krátký k ohřevu nanočástic zlata, které mohou bobtnat až do velikosti 50 nm v průměru. Puls je příliš krátký, aby poškodil obsah nano-strukturovaných kapslí, ale dostatečně silný, aby roztavil zlato. Následně dochází k roztržení polymerní vrstvy a nano-strukturované kapsle následně uvolní svůj obsah (obr. 4). Při klinickém použití může být laser zaměřen přes kůži nebo může být vyslán uvnitř těla pomocí endoskopu. Energie

infračerveného laseru ( $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) potřebná pro prasknutí nanostrukturálních kapslí je v rámci bezpečnostních mezí. Další vývoj v této oblasti by mohl vézt přes snížení velikosti kapslí z přibližně  $1 \mu\text{m}$  na pár stovek nanometrů při použití menších částic léčiva. Klinické použití, a dokonce i testy na zvířatech ale zatím nejsou možné. [2,3,5]



**Obrázek č. 4: Schematické znázornění nanostrukturované kapsle. Nanočástice zlata absorbující světlo jsou uloženy v polyelektrolytových vrstvách (A). Krátký laserový puls zahřívá nanočástice zlata, které nabobtnají a způsobují prasknutí kapsle (B).**

Převzato z: [2]

### 2.3 Dendrimery

Další možností léčby je připojení léčivých přípravků k dendrimeru nebo vložení do jeho nitra takovým způsobem, aby řídil dodávku léku. K aktivaci dendrimeru dochází konkrétním chemickým signálem, kdy následuje rozpad kostry dendrimeru v řetězové reakci několika kroků a uvolnění molekuly. Uvolněné léky (např. paclitaxel) zabíjí rakovinné buňky a zároveň produkty degradace (dendrimerové kostry) nejsou cytotoxické. Možným rizikem může být to, že pokud je spouštěč aktivován v nesprávném čase nebo místě, tak v takovém případě by výsledek mohl být nebezpečný. [2,5,6]

### 2.4 Nanobuňky

Základním problémem jejich využití v chemoterapii a léčbě rakoviny je toxicita vůči zdravým buňkám a rezistence rakovinných buněk na určité léky. Při léčbě rakoviny je

antiangiogenetická terapie elegantním řešením, založeným na hladovění nádorových buněk vlivem narušení krevního zásobení. Nicméně, nedostatek kyslíku způsobuje, že nádorové buňky uvolňují buněčnou signální molekulu, známou jako hypoxie-indukovatelný faktor-1a, který způsobuje metastázu a zároveň rezistenci k další chemoterapii. Ideálním řešením by byla kombinace chemoterapie a antiangiogeneze. Ale tato kombinovaná terapie čelí technickému problému. Dlouhodobé odstavení cév vyživujících nádor antiangiogenezním činidlem může zabránit tomu, aby nádor obdržel chemoterapeutickou látku. Také se obě léčiva chovají odlišně a jsou dodávány v různých časových obdobích: antiangiogenika jsou podávány po delší dobu a chemoterapie naopak v cyklech. [2]

V nedávných výzkumech byla navržena multifunkční nanočástice, která již umožňuje tuto kombinaci léčiv. Dvoukomorová "nanocelulární" balení léčivých látek se ukázala jako účinná a bezpečná při prodloužení přežití organismu proti dvěma odlišným formám rakoviny, tj. melanomu a Lewisově karcinomu plic, u myší. Použitím dvou různých široce studovaných biokompatibilních polymerů byl vytvořen tzv. „balón uvnitř balónu“, který se podobá skutečné buňce. Na vnější membránu nanobuňky, vyrobenou z pegylovaného fosfolipidového blokového kopolymeru, byl nanesen antiangiogenní lék combrestastatin. Na vnitřní membránu nanocelu, složenou z biologicky odbouratelné a nebiologické aktivní kyseliny polymléčné a ko-glykolové, bylo nanesen chemoterapeutické činidlo doxorubicin. Pegylace vnější membrány vytváří chemický stealth povrch, který umožňuje nanocelám uniknout imunitnímu systému. Jakmile je nanocela uvnitř nádoru, její vnější membrána se rozpadá a dochází k rychlému rozptýlení antiangiogenního léčiva. Cévní zásobení, které vyživuje nádor, se pak zhroutí. Následuje zachycení nasycené nanočástice v nádoru, kde potom dochází k pomalému uvolňování chemoterapeutického činidla. U in vivo myšího modelu způsobuje dvojnásobná nanocelulární buňka inhibici nádoru, zastavuje angiogenezi a vyhýbá se systémové toxicitě mnohem lépe než jiné varianty léčby a dodávání léčiva. Kromě toho funguje nanocela proti melanomu lépe než proti rakovině plic, což naznačuje potřebu systematicky vyhodnocovat podání správné kombinace léků. [2]

## 2.5 Speciální využití nanočástic

Jednou z dalších možností využití nanočástic jsou čipy. Senzorové testovací čipy, obsahující tisíce nanočástic, jsou schopné detekovat proteiny a jiné biomarkery, které umožňují detekci a diagnostiku rakoviny již v počátečních stádiích pouze z několika kapek pacientovy krve. [3]

Dále mohou být použity nanočástice selenidu kadmia (kvantové tečky), které září při vystavení ultrafialovému světlu. Při aplikaci injekčně přecházejí do rakovinových nádorů. Lékař díky nim může vidět zářící nádor a použít ho jako vodítko pro přesnější odstranění nádoru. [3]

## 2.6 Fotodynamická terapie

Při fotodynamické terapii je částice umístěna uvnitř těla a je osvětlena zdrojem zvenčí. Záření je absorbováno částicí, a pokud je částice z kovu, energie tohoto záření částici zahřeje a spolu s ní i okolní tkáň. Záření se může také použít k výrobě molekul kyslíku s vysokou energií, které chemicky reagují a zničí tak většinu organických molekul, které jsou vedle nich (jako jsou např. nádory). Tato terapie je z mnoha důvodů lákavá. Neopouští "toxickou stopu" reaktivních molekul v celém těle (chemoterapii), protože je zaměřena pouze na místo, kam je směřováno záření, a kde se vyskytují použité částice. Fotodynamická terapie má potenciál pro neinvazivní postup při léčbě onemocnění a růstu nádorů. [3]

## 3 Radionanomedicína

### 3.1 Bezpečnostní aspekty při využívání nanomateriálu v medicíně

Bezpečnostní hledisko použití je kritickým problémem v klinické aplikaci nanomateriálů. Ačkoli bezpečnostní otázky jsou běžné i u jiných léků, v nanomedicíně jsou mnohem složitější díky různým mechanismům toxicity a rozmanitosti nanočástic. Buněčné a subcelulární interakce nanočástic, které mohou prostupovat biologickými membránami, vyvolávají toxické účinky. Intenzivní imunitní odpověď buněk zvyšuje ROS, což vede k poškození buněk. Fagocytóza nanočástic oxidů kovu indukuje oxidační stres k tvorbě reaktivního kyslíku za autokatalýzy, který je následován produkcí cytokinů. Oxidační stres indukovaný nanočásticemi může poškodit DNA, buněčný růst, subcelulární signalizaci a případně karcinogenezi. Různé nanočástice mohou mít rozmanité mechanismy toxicity, které jsou závislé na chemickém složení, velikosti a tvaru povrchových molekul nanočástic. [4]

Jedním z nejdůležitějších faktorů nanotoxicity je však dávka nanočástic. In vivo toxicita a farmakologické účinky nanomateriálů závisí na dávce. Radionanomedicína používá sledovatelné množství nanomateriálů, které je mnohem menší než farmakologické množství. Proto in vivo účinky sledovatelných množství radioaktivně značených nanomateriálů nezávisí na fyzikálně-chemických vlastnostech samotných nanomateriálů. Tento pojem vystihuje princip nukleární medicíny. Několik diagnostických radiofarmak, široce používaných pro pacienty v nukleární medicíně, nemá žádné farmakologické účinky. To znamená, že radioaktivně značené nanomateriály lze dokonce použít i v klinickém prostředí, ačkoli jsou zde obavy z toxicity. [4]

### 3.2 Monitorování nanočástic in vivo za účelem usnadnění klinických studií

Radionanomedicína může objasnit in vivo osud nanomateriálů. Jaderné zobrazování radioaktivně značených nanomateriálů je citlivé natolik, aby dokázalo detekovat umístění použitých nanomateriálů v těle. Distribuční studie nanomateriálů může poskytnout důležité informace pro klinické studie nanomateriálů. Za prvé, monitorování in vivo objasňuje, zda upravené nanomateriály správně zaměřují specifické tkáně, jakými jsou právě tkáně rakoviny. Jelikož jaderné zobrazovací metody jsou minimálně invazivní, a je povolena kvantifikace dokonce i v hlouběji uložených orgánech lidského těla, lze tedy přesunout testování těchto metod z malých zvířat na lidské organismy. Za druhé, PET nebo SPECT určují farmakokinetiku, která je časovým vzorem místa pobytu nanomateriálů v živých organizmech. Tyto farmakokinetické informace usnadňují vývoj klinického použití nanomateriálů. [4]

Inženýrství a povrchová modifikace nanomateriálů ovlivňuje chování in vivo takovým způsobem, že radionanomedicína pomáhá nalézt optimální modifikační metody pro biomedicínskou aplikaci. Nejčastěji používanou modifikací povrchu je zavedení PEG, která slouží ke snížení vazby proteinů opsoninu v krvi. Tento proces by mohl výrazně snížit sekvestraci a zvýšit akumulaci v nádoru. Velikost částic i modifikace povrchu ovlivňují farmakokinetiku nanočástic. Zobrazování PET a SPECT by mohlo usnadnit výběr klinicky vhodně konstruovaných nanočástic, které vykazují vysokou absorpci v cílových lézích a minimální akumulaci. Navíc studie vylučování a fyziologické akumulace nanomateriálů vysvětlují pravděpodobnou toxicitu při použití farmakologických množství nanomateriálů. Například nanomateriály, které se rychle vylučují z těla, mohou mít po delší dobu systémovou toxicitu menší, než je tomu v těle. Velké množství nanočástic distribuovaných do normálních orgánů může způsobit toxicitu. Nanočástice, které se převážně vylučují hepatobiliárním systémem, mohou zvýšit sérové koncentrace při zhoršených jaterních funkcích. Proto in vivo kinetika radioaktivně značených nanočástic by mohla vysvětlit možné typy toxicity analogicky s předklinickým zobrazením. [4]

### 3.3 Modifikace strategie pro klinickou aplikaci

Většina nanočástic v biomedicínském výzkumu byla transportována ke specifickým cílům rakoviny a zánětu. Akumulace nanočástic byla závislá na dvou různých mechanismech a to "pasivní cílení" a "aktivní cílení". Pasivní cílení je výsledkem zvýšené permeability a retence (EPR). Zvýšená propustnost v zánětlivých nebo rakovinových tkáních usnadňuje akumulaci nano-velkých materiálů v těchto lézích. Ačkoli se nanočástice účinně shromažďují ve většině rakovinných tkání podle tohoto EPR efektu, pasivní zaměřování je omezeno na zajištění dodávání terapeutických nanočástic. Protože je nádor heterogenní a obsahuje hypoperfúzní oblasti, nanočástice sem nemohou dosáhnout a být nahromaděny. Teranostické nanočástice byly navrženy tak, aby na jejich povrchu byly obsaženy multiplexované cílené ligandy, které umožňují aktivní cílení. Nejčastěji používané bioaktivní molekuly jsou monoklonální protilátky. Avšak protilátky jsou omezené, protože poměrně velká velikost protilátek zvyšuje průměry nanočástic a také imunogenitu těchto nanočástic. Antigeny vázající proteiny, část monoklonální protilátky a fragmenty s jedním řetězcem jsou upřednostňovány pro modifikaci povrchu pro aktivní cílení v důsledku vyšší cílové účinnosti s nižší imunogenitou. A v poslední době jsou pro aktivní cílení preferovány přívlastky, aptamery, upravené peptidy a malé proteiny. Malé molekuly jsou také oblíbenými kandidáty na ligandy pro aktivní cílení díky jejich snadné konjugaci a nízké imunogenitě. Při aktivním



procesu cílení skutečná specifická vychytávání nanočástic závisí, kromě specifickosti ligandu-cíle, hlavně na biologické dostupnosti. Proto by nanočástice měly být upraveny tak, aby zvýšily biologickou dostupnost pro úspěšné aktivní cílení. [4]

Abychom překonali složitost povrchové modifikace a radioaktivní značení nanočástic, musí být vyvinuty jednoduché a vhodné postupy. Nanočástice mohou být navrženy pro aktivní cílení tak, aby byly radioaktivně značené pro zobrazování a upravené pro zvýšení biologické dostupnosti. Vzhledem k různým typům modifikací nanočástic by mělo být testováno jejich in vivo chování a přízniví kandidáti by byly vybíráni pro další klinické testy. Výběr nanočástic pro cílení nádorů by měl být takový, aby se vybrané nanočástice ve vysoké míře hromadily v nádoru a rychle vylučovaly z ostatních orgánů, čímž by se snížila možná toxicita. Protože in vivo kinetika a cílené vlastnosti mohou být tímto způsobem vizualizovány radioaktivním značením, měly by být testovány různé typy látek, jako jsou různé aktivně cílené ligandy (např. RGD peptidy). [4]

V nedávné době byla vyvinuta rychlá a jednoduchá modifikační metoda pro dosažení multifunkčnosti tzv. "Jeongova metoda". Tato metoda může vyrobit kovové nebo kovově oxidové nanočástice s hydrofobním povrchem a poskytnout multifunkčnost v jednom kroku. Výhodou Jeongovy metody je jednoduchost postupu, tj. smíchání funkcionalizované micely a hydrofobních nanočástic s následnou gelovou filtrací po vortexování. Celková doba modifikace by byla kratší než 2 h včetně chromatografie zaměřené na separaci určité velikosti částic. Kromě toho funkcionalizované nanočástice modifikované tímto způsobem mohou mít monodisperzní distribuci velikosti i po úplné modifikaci a značení radioaktivním krokem. Takový proces pomáhá in vivo testování nanočástic pro výběr kandidátů na další klinické testy, které vykazují vysoký poměr koncentrace poškozených orgánů k normálním orgánům a odpovídajícím cílům. Očekává se, že komfort a robustnost tohoto postupu přispěje a podpoří výzkum nanomedicíny. [4]

### 3.4 Problémy chování in vivo vyšetřované radionanomedicínou

Hlavní výhoda radionanomedicíny spočívá v její schopnosti kvantitativně zkoumat distribuci nanočástic in vivo. Distribuce in vivo stanovená pomocí PET nebo SPECT zobrazování poskytuje zásadní informace o místě výskytu nanočástic, předpovědi toxicity, dozimetrii pro specifické tkáně a vzorcích vylučování. Fluorescenční zobrazování samotných nanočástic (například kvantových teček) nebo značených barviv na nanočásticích je snadný a jednoduchý způsob, jak rozpoznat distribuci těchto nanočástic in vivo. Toto optické zobrazování však není vhodné pro aplikaci u lidí vzhledem k omezené hloubce pronikání,

stejně tak jako k toxicitě nanočástic. Sériové zobrazování je možné s radioaktivně značenými nanočásticemi i pro lidské orgány umístěné hluboko v těle, což umožňuje další kvantitativní analýzu. Navzdory síle radioaktivně značených nanočástic pro sledování in vivo existuje několik potenciálních úskalí pro klinickou translaci radioaktivně značených nanočástic. [4]

In vivo distribuce a cílové vlastnosti jsou ovlivněny fyzikálně chemickými faktory radioaktivně značených nanočástic. Velikost a tvar nanočástic jsou hlavními faktory, které ovlivňují clearance, fagocytózu a trvání oběhu. Geometrie částic a povrchový náboj ovlivňují buněčnou internalizaci zprostředkovanou endocytózou. Například nesféricky tvarované a pozitivně nabitě částice umožňují snadnou internalizaci nanočástic. Několik biologických faktorů, stejně jako tyto fyzikálně-chemické vlastnosti, ovlivňují také distribuci in vivo. Po in vivo podání nanočástic, které se liší mezi zvířaty a lidmi, dochází k několika biochemickým reakcím. To je také případ radioaktivně značených nanočástic. Jakmile jsou nanočástice podávány v tělních tekutinách, objeví se v našem těle různé molekuly, které mění povrch nanočástic. Tyto biologicky vytvořené vrstvy bílkovin na jejich povrchu se nazývají proteiny korony. Jejich složení a vzory se mění v závislosti na fyzikálních vlastnostech nanočástic i na povaze tělních tekutin. Proteiny korony jsou známé tím, že významně ovlivňují distribuci in vivo a cílenou distribuci. Kromě toho se složení proteinové korony mění podle stavu choroby, a dokonce ukazuje rozdíl mezi jednotlivými pacienty. [4]

Dalším problémem v klinickém in vivo chování, které odhalila radionanomedicína, je skutečnost, že radioaktivně značené nanočástice tvoří jen malý zlomek nanočástic. Kromě toho distribuce vlastností nanočástic znamená, že vzorky nanočástic jsou do určité míry nehomogenní. Postupy radioaktivního značení by mohly ovlivnit variabilitu vlastností nanočástic, protože jednoduché postupy mohou vytvářet agregované nanočástice. Navíc radioaktivně značené nanočástice by se mohly částečně lišit od neznačených nanočástic, protože radiolabelové postupy mohou do jisté míry nanočástice měnit. Nanočástice s chelatačními látkami by mohly ovlivnit povrchové plochy a tvary nanočástic, které mění chování in vivo ve srovnání s neznačenými nanočásticemi. Metody charakterizace nanočástic, jakou je např. elektronová mikroskopie, dynamický rozptyl světla a měření zetapotenciálu, by měly být bezpodmínečně provedeny s radioaktivně značenými nanočásticemi ve srovnání s neoznačenými pro klinické použití. Odlišnou cestou vylučování byla také uvedena přímá exkrece ze střev zprostředkovaná pohárkovými buňkami, která nebyla zprostředkována hepatobiliární exkrecí. Vzhledem k této složitosti distribuce in vivo a vylučování nanočástic, které se mohou mezi jednotlivci lišit podle typu nanočástic, je nutná individualizovaná distribuční studie, která by uvážila budoucí klinické aplikace. Jednoduše řečeno, distribuce in

vivo je ovlivněna několika jednotlivými faktory. In vitro stabilita nemůže být přímo přenášena do situací in vivo, protože po podání dochází k různým biochemickým reakcím. Složitost a nejistota distribuce, metabolismus a vylučování nanočástic naznačuje, že všechny nanočástice potřebují individualizovanou studii biodistribuce na bázi lidské radionomedicíny. [4]

### 3.5 Radionanomedicína endogenních nanočástic

Anorganické exogenní nanočástice byly zkoumány pro biomedicínskou aplikaci s náležitými obavami ohledně bezpečnosti in vivo. Vzhledem k tomu, že nepoužíváme farmakologické množství, ale pouze stopové množství radioaktivně značených nanočástic, nemusíme mít obavy z možné toxicity těchto nanočástic. [4]

V tomto aspektu nedávno dostaly velkou pozornost endogenní nanočástice. Většina živých organismů, od jednobuněčných až po komplexní mnohobuněčné organismy, využívá extracelulární vezikuly pro intercelulární komunikaci. Tyto extracelulární vezikuly můžeme považovat za endogenní nanomateriály a naopak, lipozomy lze považovat za exogenní organické nanomateriály, které jsou extracelulární. Vzhledem k tomu, že mohou být navrženy pro diagnostické a terapeutické účely exogenní nanomateriály, očekává se, že se podaří vyhnout obavám z toxicity a případně imunitní odpovědi. [4]

Extracelulární vezikuly patří do širokého spektra vezikul vylučovaných různými typy buněk. Mohou se nacházet ve většině typů tělesných tekutin, včetně séra, moči a slin. Extracelulární vezikuly se sestávají v podstatě z lipidové dvojvrstvy obsahující proteiny, cytosolové složky a nukleové kyseliny, které nesou biologickou informaci pro intercelulární komunikaci. Tak mohou být použity jako nanonosiči, kteří transportují genetické materiály a proteiny, stejně jako léky. Vlastnosti exozomu (extracelulární vezikuly) jako nosiče dále zesiluje jednoduchá schopnost hromadit lipofilní léky (doxorubicin nebo kurkumin) a hydrofilní molekuly (terapeutické nukleové kyseliny). [4]

Dalším příkladem terapeutického použití extracelulárních vezikulů pro léčbu rakoviny byla imunoterapie založená na exozomech. Vzhledem k tomu, že exozomy jsou schopny transportovat nádorové antigeny a tím vyvolávat imunitní odpovědi, byla jako rakovinná terapeutika navržena právě protinádorová imunitní reakce odvozená od exozomu. Přestože je biomedicínská aplikace extracelulárních vezikulů slibná, chování a distribuce podávaných extracelulárních vezikulů in vivo jsou dosud neznámé. Navzdory výhodám v biokompatibilitě extracelulárních vezikulů pro in vivo, při podávání nebyla kinetika a chování in vivo zcela pochopena. Takto by radioaktivně značené extracelulární vezikuly, pro kvantifikaci

systemové distribuce mohly usnadnit jejich klinické použití. Několik studií, které používaly exozomy jako terapeutika, se zaměřilo na terapeutické účinky v cílových tkáních bez studie distribuce in vivo. [12, 13] Radioaktivně značené exozomy mohou objasnit, zda se zaměřují na specifické tkáně, stejně jako popisují distribuci, tj. fyziologické chování exozomů v těle. Pro klinické použití extracelulárních vezikul v radionanomedicině je zapotřebí mnoho dalších studií. Nízký výtěžek exozomů produkovaných z kultivovaných buněk omezuje hodnocení terapeutické použitelnosti extracelulárních vezikul, stejně jako zobrazovací studie s radioaktivním značením. Vezikuly vylučované z buněk jsou izolovány a čištěny různými způsoby, včetně ultracentrifugace, filtrace a imunoafinitní izolace z kultivačního média nebo biologických tekutin. Velkokapacitní výroba pro použití in vivo je však obtížná. [4]

Nedávno vyvinutá metoda, která shromažďuje exozi-mimetické nanovezikuly z celých buněk, by mohla být alternativou. Radionanomedicina s vysokou detekční citlivostí může přispět k překonání tohoto problému s nízkým výtěžkem radioaktivně značených exozomů. Stejně jako exogenní nanočástice jsou metabolizovány a degradovány v těle, jsou také extracelulární vezikuly rychle degradovány. Umístění radionuklidů tedy nemusí odrážet přesné rozložení samotné vezikuly. Jednoduché měření chromatografií na tenké vrstvě, které je schopné rozlišovat radioaktivně značené extracelulární vezikuly od degradovaných extracelulárních vezikul, by bylo užitečné pro lepší pochopení stability a distribuce in vivo radioaktivně značených extracelulárních vezikul. Dále, jelikož extracelulární vezikuly jsou izolovány z různých buněk nebo se nacházejí v jakýchkoli tělesných tekutinách, jejich složení se mění v závislosti na stavu buněk. Nedávné studie o chování extracelulárních vezikul in vivo jasně prokázaly, že jejich distribuce in vivo se liší v závislosti na zdrojích buněk nebo cestách podání. Například exozomy odvozené od dendritických buněk kostní dřeně byly směřovány spíše k tkáni sleziny, tak exozomy odvozené od svalových buněk nebo exozomy odvozené od melanomu se akumulovaly více v játrech a plicích. Jejich rozdílná vnitřní schopnost navázání může pomoci navrhnout in vivo terapeutické extracelulární vezikuly jako nosiče pro dodávání léčiva do požadované tkáně. Tato složitost a rozmanitost extracelulárních vezikulů naznačuje, že zobrazování radioaktivně značených extracelulárních vezikulů by mělo být rutinně prováděno, pokud je dále zvažováno jejich využití pro klinické terapie. [4]

## 4 Tkáňové inženýrství

Nanotechnologie může být schopna pomoci při reprodukci nebo opravě poškozených tkání. "Tkáňové inženýrství" využívá uměle stimulované buněčné proliferace pomocí vhodných konstrukcí založených na nanomateriálech a růstových faktorech. Jako příklad mohou posloužit uhlíkové nanotrubičky, díky nimž by tak mohly například lépe a rychleji srůstati kosti. Tkáňové inženýrství by mohlo nahradit dnešní konvenční léčbu, jakou jsou transplantace orgánů nebo umělé implantáty. Pokročilé formy tkáňového inženýrství mohou vést k celkovému prodloužení života. [3,6]

### 4.1 Biomateriály

Biomateriály hrají v tkáňovém inženýrství klíčovou roli. Slouží jako 3D syntetické rámce (běžně označované jako lešení, matice nebo konstrukty) pro buněčné připojení, proliferaci a v konečném důsledku vedou k novému formování tkáně. Řada nových přístupů byla vyvinuta pro výrobu 3D materiálů založených na tzv. lešeních z biomateriálů. V poslední době jsou systémy lešení na bázi nanovláken zkoumány jako lešení pro tkáňové inženýrství. Rozvoj nanovláken rozšířil obzor pro výrobu lešení, která mohou potenciálně napodobovat složení přirozené lidské tkáně v nanometrovém měřítku. Vysoký poměr plochy povrchu k objemu nanovláken v kombinaci s jejich mikroporézní strukturou upřednostňuje buňku k adhezi, proliferaci, migraci a diferenciaci, což jsou vysoce žádané vlastnosti pro aplikace tkáňového inženýrství. Proto současný výzkum v této oblasti směřuje k výrobě a aplikaci nanovláknenných systémů jako lešení pro tkáňové inženýrství. Vzhledem ke svému potenciálu jsou systémy na bázi nanovláken také sledovány pro různé biologické a nebiologické aplikace. [7]

### 4.2 Metody syntézy nanovláken

V současné době jsou k dispozici tři techniky syntézy nanovláken: elektrospinning, samosestavování a separace fází. Elektrospinning je nejvíce studovaná technika a také se zdá, že vykazuje nejvíce pozitivních výsledků pro aplikace tkáňového inženýrství. Nanovláknata syntetizovaná samostavbou a separací fází měla poměrně omezené studie co se týče jejich použití jako lešení pro tkáňové inženýrství. Existuje celá řada technik pro syntézu uhlíkových nanovláken, jako jsou CVD (= chemical vapor deposition) metody, depozice pomocí templátové metody, katalytická syntéza (katalytická depozice, fluidní katalyzátor), syntéza pomocí radiofrekvenčně podporovaných mikrovlnných vln plazmatu. [7]

#### 4.2.1 Elektrospinning

Elektrospinning představuje další atraktivní techniku zpracování polymerních biomateriálů do nanovláken. Tato technika také nabízí možnost kontroly tloušťky a složení nanovláken spolu s pórovitostí nanovláčkových sítí pomocí relativně jednoduchého experimentálního nastavení. Ačkoliv je pojem elektrospinning nebo elektrosprejování znám již více než století, o téma výroby polymerních nanovláken elektrospinningem byl velký zájem především až v posledním desetiletí. Vysoká povrchová plocha a vysoká pórovitost elektrospinnových nanovláken umožňuje vhodnou buněčnou interakci, a proto z nich činí potenciální kandidáty na aplikace pro tkáňové inženýrství. [7]

V procesu elektrospinningu jsou vlákna v rozsahu od 50 nm do 1000 nm nebo delší a mohou být vyráběna využitím elektrického potenciálu polymerního roztoku. Řešení je na základě povrchového napětí kapilární trubice. Aplikovaný elektrický potenciál poskytuje polymeru náboj. Vzájemné odpuzování náboje v roztoku polymeru indukuje sílu, která je přímo opačná k povrchovému napětí roztoku polymeru. Zvýšení elektrické energie potenciálně vede k prodloužení polokoule na povrchu kapiláry, což vytvoří kuželový tvar známý jako Taylorův kužel. Další podmínkou je, aby elektrický potenciál dosáhl kritické hodnoty, při které je překonáváno povrchové napětí. To způsobuje vznik trysky, která vychází z hrotu Taylorova kužele. Nabitá tryska se postupně stává nestabilní a postupně se na vzduchu rozpadá především z důvodu prodloužení a odpařování rozpouštědla. Nabitá tryska zformuje náhodně orientovaná nanovlákna, která mohou být shromažďována na stacionárním nebo rotujícím uzemněném kovovém kolektoru. Elektrospinning vznikl elektrosprejováním, kde je elektrický náboj dodáván do vodivé kapaliny. Zde dochází k produkci proudu, který se dělí na jemné částice, které se podobají spreji, proto název electrospraying. Pokud by se pro proces elektrosprejování použil polymer s dlouhým řetězcem, místo látky s nízkou molekulovou hmotností, nedocházelo by k rozdělení proudu na částice. Proto je třeba pro techniku elektrospinningu / elektrosprejování použít polymery (přírodní nebo syntetické). [7]

Pro elektrospinnová nanovlákna se používá široké spektrum polymerů. Přírodní polymery jako je kolagen, želatina, chitosan, kyselina hyaluronová nebo hedvábné vlákno jsou zkoumány pro tvorbu nanovláken, která mohou vytvářet potenciální řešení pro aplikace tkáňového inženýrství. Nedávno bylo také prokázáno, že nanovlákna proteinu mají slibné použití ve tkáňovém inženýrství. Mezi syntetické polymery zkoumané pro výrobu nanovláken patří PLA (= poly lactic acid), PU (= polyurethane), PCL (= poly e-caprolactone), PLGA (= poly lactic-coglycolic acid), PEVA (= poly ethylene-co-vinylacetate) nebo PLLA-CL (= poly lactide-co-e-caprolactone). [7]

Proces elektrospinningu je ovlivněn dvěma soubory parametrů: parametry systému a parametry procesu. Systémové parametry, jako je molekulová hmotnost polymeru a distribuce určují rychlost degradace nanovláken. Parametry systému jsou vlastnosti roztoku polymeru jako například viskozita, povrchové napětí a vodivost, určují průměr nanovláken a snižují možnost tvorby kapiček. Parametry procesu, jako je průměr otvoru, průtok polymeru a elektrický potenciál ovlivňují průměr vlákna. Parametry procesu, jako je vzdálenost, rozsah mezi kapilárou a kovovým kolektorem určuje odpařování rozpouštědla z nanovláken a depozici na kolektoru, zatímco pohyb kolektoru určuje vytváření vzoru během ukládání vláken. Systémové a procesní parametry se liší s různými polymerními systémy a ve většině případů je lze upravit a umožnit tak přizpůsobení nanovláken pro specifická konečná použití. Během procesu elektrospinningu náboj na polymeru umožňuje pomocí elektrického pole kontrolovat jeho trajektorii. Tato kontrola umožňuje výrobu orientovaných nanovláken, které mohou být užitečné při navrhování skeletu pro tkáňové inženýrství. Konvenční elektrospinning vyrábí nanovlákná, která jsou orientovaná náhodně. Záměr nanovláknenného uspořádání je poháněn touhou přímého růstu buněk a dosažení definovanějšího růstu buněk. To by bylo zvláště užitečné v některých aplikacích tkáňového inženýrství, jako je neuronové tkáňové inženýrství, kde je žádoucí směrový růst neuronů/axonů. Některé nedávné studie se snažily dosáhnout vyrovnání nanovláken použitím rotujícího disku s ostrými hranami pro ukládání nanovláken. Naostřená hrana poskytuje koncentrované množství elektrostatické síly, která způsobuje přitažlivost iontů a nanosení nanovláken podél okraje rotujícího disku pro výrobu nanovláken. Sundaray a kol. v roce 2004 prokázal, že můžeme ovlivnit několik dalších parametrů vyrovnání nanovláken, jako je například snížení vzdálenosti elektrod, vyšší koncentrace polymeru a použití jediného ostrého kolíku jako sběrné elektrody. [14] V další studii vyvinuli Li a kol. metodu sběru elektrospinnových nanovláken pomocí vzorovaných elektrod. V této studii autoři využili skutečnosti, že diskretní vláknité segmenty mají tendenci získat orientaci ve směru minimálního čistého točivého momentu. [15] Tyto studie ukázaly, že srovnání a montáž nanovláken může být změněna změnou konstrukčního vzoru sběrné elektrody. Spolu s výhodou výroby nanovláknenných sítí s vysokou porézností a povrchovou plochou a elektrostatickým zvlákněním, může být technika aplikována na širokou škálu přírodních a syntetických polymerů, což z ní činí velmi univerzální techniku. Tato technika je však také spojena s omezením jako je široký rozsah tloušťky vláken, náhodná orientace nanovláken a slabších mechanických vlastností síťových ok. [7]

#### 4.2.2 Samosestavování

Eukaryotické buňky mohou vnímat své místní prostředí prostřednictvím buněčných receptorů, které rozpoznávají své odpovídající markery extracelulární tkáně, jako je kolagen a fibronektin. Pro napodobení lidského ECM, Berndt a kol. syntetizovali peptidový amfifilní (PA) samoinstalační systém s cílem navrhnout jednoduchý samo-montážní systém, který umožňuje tvorbu tepelně stabilní molekulární struktury podobné proteinům. [16] Autoři vyvinuli PA, který se skládá z dialkylového řetězce (hydrofobní složka/koncová skupina) připojeného k N-alfa aminoskupině peptidového řetězce (hydrofilní složka/hlava), což má za následek „peptidový amfifil“. Skupiny peptidů byly odvozeny ze sekvence ECM kolagenového ligandu. Syntetizovaná skupina PA hydrofilních hlav obsahovala Gly-Val-Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Asn-Pro-Gly-Trp-Pro-Gly-Ala-Pro, který je podobný lidské  $\alpha 1$  (IV) 1263-1277 kolagenové sekvenci. V další studii nahradil Yu a kol. dialkyl řetězce PA použité v předchozí studii monoalkylem řetězce. [17] Ukázali tím, že se zvětšením délky monoalkylového řetězce od C6 do C16 se tepelná stabilita PA zvýší v důsledku hydrofobní interakce mezi alkylovými řetězci. [19] Na základě předchozích znalostí samo-montážních systémů PA navrhli Stupp a kol. di- a triblokové PA, které se samy sestavily do tyčovitě struktury. [20] Při konstrukci skupiny peptidových hlav PA, autoři vyvinuli novou techniku pro vlastní montáž PA do nanovláken pomocí regulace pH. Syntéza PA zahrnovala následující kroky: 1. Inkorporace zbytku fosfoserinu pro umožnění zvýšené mineralizace hydroxyapatitu (HA), 2. Inkorporace RGD (Arg-Gly-Asp) peptidu pro zvýšení buněčné adheze zprostředkované integrinem, 3. Začlenění čtyř po sobě následujících cystinových zbytků, které tvoří intermolekulární disulfidové vazby, které polymerují a poskytují lepší strukturní stabilitu a 4. Zahrnutí flexibilní oblasti linkeru sestávajícího ze tří zbytků glycinu pro zajištění pružnosti hlavy. Příprava nanovláken zahrnovala redukci cystinových zbytků PA k volným thiolovým skupinám s použitím dithioeritolu následovaný okyselením pod pH 4 za samosestavení PA do válcových micel/nanovláken. Výsledná nanovlákná měla hydrofobní jádro z alkylových zbytků a hydrofilního exteriéru lemovaného peptidovými zbytky. Výsledky ukázaly, že vyráběná nanovlákná samosestavením měla přibližně 5–8 nm v průměru a několik mikrometrů na délku. Hartgerink a kol. dále zkoumali mineralizační potenciál nanovláken. [21] Autoři pozorovali tvorbu HA krystalů, které byly orientovány podél délky nanovláken. Tato orientace v nanoúrovni se podobá orientaci HA krystalu v mineralizovaném ECM a kolagenních vláknech kostní tkáně. Díky tomu se mineralizovaná samo-sestavená nanovlákná podobají nejnižší úrovni hierarchické struktury kostní tkáně a autoři věří, že nanovlákná bude možné aplikovat jako primární stavební bloky používané v



inženýrství kostí nebo jiných minerálních tkání. V další studii zkoumal Hartgerink a kol. vliv změn v molekulární struktuře PA na samonosných nanovláčkách. [18] To bylo nejlépe pozorováno na modifikaci délky alkylového řetězce PA pozměněné pH citlivostí nanovláček, která ovlivňuje vlastní montáž. Modifikace C-terminální oblasti (tj. oblasti, která je po nanosení na povrchu nanovláček) vedla ke změnám délky a tuhosti nanovláček. Výměna cysteinových zbytků za alanin neovlivní samočinnou montáž PA do nanovláček. Tyto výsledky ukázaly, že samonosná nanovláčka ukazují potenciál pro vývoj nových biomateriálů. Tato studie také představila tři různé metody tvarování samonosných PA, včetně samočinné montáže s řízeným pH, sušení na samosestavování s povrchovou indukci a samonosné konstrukce indukované divalentním iontem. Studie ukázala, že PA mohou být samovolně sestaveny zpětně do nanovláček, což má za následek tvorbu gelu pomocí změn pH. Tato PA nanovláčka mohou být také reverzibilně polymerizována, aby se zlepšila jejich stabilita. Díky reverzibilitě těchto dvou postupů je technika samosestavení atraktivní, protože umožňuje výrobu pozoruhodně univerzálních materiálů. Navíc tato technika produkuje dobrý výtěžek nanovláček s nízkou polydisperzitou. Proto technika samo-sestavení, na základě možné úpravy ve struktuře PA umožňuje rozmanitost samo-sestav včetně vrstev a lamel a na základě výše uvedených reverzibilit a propůjčuje systému flexibilitu. Technika vykazuje dobrý potenciál pro další zkoumání a je cílem navrhování nových skeletů pro aplikace v tkáňovém inženýrství. [7]

#### 4.2.3 Separace fází

Motivace k napodobení 3D struktury přítomného kolagenu v přirozeném ECM vedla Maa a Zhanga k vývoji nové techniky zvané tepelně indukovaná kapalina - separace kapalnou fází pro tvorbu nanovláčkových pěnových materiálů. [22, 23] Nanovláčko pěny vyrobené technikou fázové separace má velmi podobnou velikost jako přirozený kolagen přítomný v ECM tkáně (50–500 nm). Tato technika zahrnuje pět základních kroků: 1. rozpuštění polymeru, 2. proces separace kapalina-kapalina, 3. gelování polymeru (řízené pórovitostí nanočásticového lešení při nízké teplotě), 4. extrakce rozpouštědla z gelu vodou, 5. zmrazení a sublimační sušení ve vakuu. Bylo zjištěno, že gelování polymeru je nejkritičtější krokem, který je řízen porézní morfologií pěnových nanovláček. Doba gelování se mění s koncentrací polymeru a teplotou. Nízká teplota gelování vede k vytváření sítí s nanočásticemi, zatímco vysoká teplota gelování vede k vytvoření destičkovité struktury v důsledku nukleace krystalů a jejich růstu. Toto omezení tvorby struktury krevních destiček bylo překonáno zvýšením rychlosti chlazení, díky kterému byly připraveny jednotná

nanovlákna. Bylo zjištěno, že parametry procesu, jakým je např. koncentrace polymeru, má významný vliv na vlastnosti nanovláken. Zvýšení koncentrace polymeru snižuje pórovitost a zlepšuje mechanické vlastnosti. Jiné parametry procesu, jakými jsou typ polymeru, typ rozpouštědla a tepelné zpracování, ovlivňuje také morfologii nanovláknenného lešení. 3D porézní kontinuální vláknitá síť tvořená procesem separace fází vykazuje vysokou porozitu přibližně 98% v rámci bloků materiálu. Ma a Zhang zavedli makroporozitu do skeletu pomocí inkorporace porogenu, jakým je cukr a sůl, do formy spolu s roztokem polymeru během separace fází. [23] Makroporozita byla zavedena se záměrem zlepšení hromadné dopravy a distribuce buněk a organizace tkáně. Díky tomu lešení získaná touto technikou mají tři úrovně struktury: první – makroporézní (~ 100  $\mu\text{m}$ ), kde je velikost a tvar pórů řízena porogenem; druhá, mezivláknová vzdálenost, která je určena koncentrací polymeru; a třetí, průměr vlákna. Autoři pak studovali nanovláknenné skelety pro jejich interakci s buňkami osteoblastu. Výsledky ukázaly, že nanovláknům vzrostla buněčná adheze a adsorpce proteinu (fibronektin a kolagen), což jsou vlastnosti, které jsou nezbytné pro buňku a interakce ECM. [7]

Výhodou procesu separace fází je, že tento proces probíhá poměrně jednoduchým způsobem a pokud jde o vybavení, tak požadavky jsou minimální, ve srovnání s dříve diskutovanými technikami elektrospinningu a samosestavení. Je proto možné vyrobit lešení, které bude mít přímo požadovaný anatomický tvar části těla. Další výhodou je současná přítomnost nano a makro struktur, které mohou být přínosné z hlediska buněčné odezvy na úrovni nanovláken a struktury tkání na úrovni makroporozity. [7]

### 4.3 Nanovlákna v tkáňovém inženýrství kosterní svaloviny

Kosterní svaly jsou zodpovědné za volný pohyb a po poškození (onemocněním nebo traumatem) u dospělých obtížně regenerují. Tudíž je tkáňové inženýrství kosterních svalů vzrušující alternativou chirurgických technik pro regeneraci kosterních svalů. Riboldi a kol. zkoumali použití elektrospinnových mikrovláken, vyrobených z degradovatelného PEU, jako kostry pro svalové tkáňové inženýrství. [24] Na základě předběžných informací studie využívající primární lidské satelitní buňky (biopsie z 38-leté ženy), C2C12 (myší buněčná linie myoblastu) a L6 (krysí myoblastová buněčná linie), jejich výsledky ukázaly, že elektrospinnová mikrovlákna PEU vykazovala uspokojivé výsledky v mechanických vlastnostech povzbuzování buněčné odezvy z hlediska adheze a diferenciací. Zmíněná studie ukázala potenciál elektrospunových mikrovláken PEU pro další výzkum jako lešení pro skeletální svalové tkáňové inženýrství. [7]

#### 4.4 Nanovláknna pro kožní tkáňové inženýrství

Kožní rány se normálně hojí tvorbou epitelizovaných jizev spíše než regenerací plné kůže. Ze dvou vrstev kůže, epidermis a dermis, má epidermis menší schopnost hojení. Nicméně když je třeba vyměnit velkou plochu epidermis, chybí normální regenerace. Dále, dermis má enormní schopnost regenerace. Jizvové tkáni, která se tvoří v nepřítomnosti dermis chybí elasticita, pružnost a síla normální dermis. V důsledku toho jizvené tkáně mají omezenou hybnost, což způsobuje bolest a zároveň je to kosmeticky nežádoucí. Proto by umělá kožní tkáň byla vynikající alternativou, nejen pro zavření rány, ale také pro stimulaci regenerace dermis. Spolu s kolagenem bylo zkoumáno několik dalších přírodních a syntetických polymerů pro tkáňové inženýrství kůže, nicméně použití těchto biomateriálů jako nanovláken je velmi omezené. Min a kol. vyvinuli netkaná hedvábná fibroinová nanovláknna vyrobená elektrospinningem pro kožní tkáňové inženýrství. [25] Vzhledem k jejich vysoké pórovitosti a velké ploše v poměru k objemu bylo zjištěno, že fibroinová nanovláknna potažená kolagenem typu I podporují adhezi keratinocytů/fibroblastů a jejich růst. Nanovláknna z hedvábného fibroinu proto ukazují potenciál, aby byla v budoucnu vyvíjena jako možná řešení pro kožní tkáňové inženýrství. Khil a kol. studovali elektrospinnové nanovláknenné membrány z PU pro obvazové materiály. [26] PU membrány z nanovláken poskytly vynikající propustnost pro kyslík a řízené odpařování vody. Výhodou těchto vlastností je, že nanovláknenné membrány umožňují odvod tekutiny z rány, zatímco brání její dehydrataci. Dále velmi jemná pórovitost PU membrány z nanovláken nedovolí invazi exogenních mikroorganismů. Tyto výsledky ukázaly, že PU membrány z nanovláken vykazovaly potenciál pro rozvoj obvazového materiálu. [7]

#### 4.5 Nanovláknna pro tkáňové inženýrství krevních cév

Od začátku studia vývoje cévních štěpů s použitím materiálů, které minimálně interagují s proudící krví a přilehlými tkáněmi, mají vědci před sebou dlouhou cestu k vývoji konstrukcí v nanoměřítku, které interagují s buňkami a způsobují tvorbu krevních cév. Konvenční elektrospinning vyrábí náhodně orientovaná nanovláknna. Mo a kol. používají biologicky odbouratelné nanovláknenné řešení PLLA-CL a rotující kolektor pro sběr zarovnaných elektrospinnových nanovláken. [27] Tyto zarovnaná nanovláknna byla zkoumána kvůli výrobě trubkového řešení, které by mohlo být použito pro inženýrství krevních cév. Jejich výsledky ukázaly, že vlákna v nanovelikosti napodobují rozměry přírodního ECM, poskytují mechanické vlastnosti srovnatelné s lidskou koronární tepnou a tvoří výborně definovanou strukturu pro adhezi buněk hladkého svalstva a proliferaci. Vyrovnaná vlákna

poskytují nejen strukturní integritu, ale také udržují vasoaktivitu, protože poskytují nezbytnou mechanickou sílu potřebnou k udržení vysokého tlaku člověka v oběhovém systému. Xu a kol. studovali odpověď endotelových buněk spolu s buňkami hladkého svalstva (SMC) na vyrovnaná nanovlákná PLLA-CL a jejich výsledky ukázaly u obou typů buněk zvýšenou míru adheze a proliferace nanovláknového lešení. [28] Kromě toho bylo zjištěno, že SMC organizace cytoskeletu byla prodloužena ve směru nanovláken. Tyto výsledky naznačují, že sladěná nanovlákná mohou poskytnout dobrý systém lešení pro cévní tkáňové inženýrství. Je známo, že buňky se velmi dobře připojují a organizují kolem vláken s průměry menšími, než jsou jejich rozměry. Boland a kol. vyvinuli electrospinnová micro a nanovlákná lešení z přírodních polymerů, jako jsou kolagen a elastin, s cílem vyvinout konstrukce pro vaskulární tkáňové inženýrství. [29] Jejich výsledky ukázaly, že elektrospinnová kolagenová a elastinová nanovlákná byla schopná napodobit složité strukturované komplexy potřebné pro cévní konstrukci a byla schopná poskytnout dobré mechanické vlastnosti, které jsou žádoucí v prostředí proudící krve. Jejich studie ukázala, že mikro a nanovlákná lešení syntetizovaná z přírodních polymerů, jako jsou kolagen a elastin by mohla být užitečné při konstrukci umělé cévy. [7]

## 5 Závěr

I když očekávání od nanotechnologií v medicíně jsou vysoká a další potenciální přínosy jsou neustále objevovány, tak bezpečnost nanomedicíny není zdaleka plně definována. K využití nanotechnologií v medicíně potřebují lékaři adekvátní hodnocení rizika a bezpečnostních faktorů. Je však možné, že nanomedicína v budoucnu může sehrát zásadní roli při léčbě lidských nemocí a také při zlepšování normálního fyzického stavu člověka. Se souběžnou aplikací nanotechnologií v jiných oblastech, je pravděpodobné, že bude aplikace nanotechnologií dále rozšiřovat na diagnostiku a molekulární výzkumné techniky.

Nanotechnologie nabízí nové důležité nástroje, u nichž se očekává, že budou mít velký vliv na mnohé oblasti zdravotnické techniky. Poskytuje mimořádné příležitosti nejen pro zlepšení materiálů a zdravotnických prostředků, ale také pro vytvoření nových „inteligentních“ zařízení a technologií. Očekává se, že se zrychlí vědecké i ekonomické činnosti v oblasti lékařského výzkumu a vývoje. Nanotechnologie má potenciál významně přispět k odhalování nemocí, diagnostice, terapii a prevenci a nástroje jsou důležitou a nedílnou součástí pro včasnou detekci. Předpokládá se vývoj nových nástrojů a nástrojů doplňujících stávající nástroje. Nanotechnologie by mohla mít velký vliv na oblast prevence nemocí, protože nabízí inovativní nástroje pro pochopení buňky a stejně tak pro pochopení rozdílů mezi normální a abnormální buňkou. Dále poskytuje nové neinvazivní pozorovací metody do buněčného aparátu. Umožňuje takovou analýzu parametrů jako je například buněčná mechanika, morfologie a cytoskelet, které bylo dosud obtížné dosáhnout pomocí konvenčních technologií.

Nanostrukturované materiály a jejich povrchy mohou hrát zásadní roli při interakci materiálů s částmi lidského těla. Z nedávného vývoje nanotechnologií již profitovalo několik zdravotnických prostředků. Tyto zdravotnické prostředky se již používají nebo jsou v současné době komercializovány. Jedná se například o nanostrukturované materiály pro náhradu kostní hmoty umožňující lepší zpracování a integraci implantátů a obvazy na rány a textilie obsahující nanokrystalické částice s antibakteriálním a fungicidním účinkem.

V současné době se v klinické praxi vyhodnocuje řada dalších lékařských aplikací nebo se očekává, že v blízké budoucnosti vstoupí do klinického výzkumu cílené nanočástice fyzicky spouštěné použitím tepla, magnetického pole, světla nebo zářením pro léčbu nádoru nebo nanoplatformy založené na dendrimeru schopné dodávat léky a geny ke specifickým cílovým buňkám s modifikací zobrazování/monitorování.

Také v oblasti molekulárního zobrazování, kde jsou první aplikace již na trhu, je na obzoru neustálý vývoj. Zvláště v boji proti rakovině je cenný čas a očekává se proto, že bude umožněna včasná diagnostika. Nano-strukturované materiály nebo povrchové úpravy budou i nadále zlepšovat biokompatibilitu rostoucího sortimentu přístrojů a lešení pro produkty tkáňového inženýrství. Očekává se, že práce na nanofibrilárních sítích vyrobených samosestavením se sblíží pokroku hlavně v buněčné biologii za účelem poskytnutí funkčních skeletů pro tkáňové inženýrství v následujícím desetiletí.

Podstatná část vědeckého výzkumu je stále v plenkách. Ačkoli mnoho výzkumů představují pouze koncepce důkazů o výsledcích, bylo dosaženo značného pokroku. Zda budou převedeny koncepty důkazů do reálných zdravotnických prostředků a nakonec budou komercializovány, to se teprve uvidí. Tyto „prototypy“ čekají na další laboratorní a preklinická vyšetření. Určitě pro některé zařízení a aplikace to bude trvat ještě několik let.

## 6 Použitá literatura

1. HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.
2. ROZEK. B., W. H. DE JONG a R. E. GEERTSMA. *Nanotechnology in medical applications: state of the art in materials and devices*. 265001001. RIVM, 2005.
3. PRIYADHARSHINI, S. a B. DHIVYA. *Application of Nanoscience and Technology in Medicine-Nanomedicine*. 2013, 300-304. ISSN 0976-2973.
4. HONGYOON, Choi, Lee YUN-SANG, Hwang DO WON a Lee DONG SOO. *Translational radionanomedicine: a clinical perspective*. 2016, 71-84. DOI: 10.1515.
5. SURENDIRAN, A., S. SYNDHIYA, S. C. PRADHAN a C. ADITHAN. *Nanotechnology in medicine: Novel applications of nanotechnology in medicine* [online]. Prosinec 2009, 689-701 [cit. 2019-04-28].
6. ŠRÁMEK, Jaromír. *Nanotechnologie v medicíně*. Brno, 2009. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta - Biofyzikální ústav. [cit. 2019-04-28]
7. VASITA, Rajesh a Dhirendra S KATTI. *International Journal of Nanomedicine: Nanofiber and their application in tissue engineering* [online]. In: Únor 2006, s. 15-30 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.2147/nano.2006.1.1.15.
8. KRÁL, Vladimír, Jan ŠOTOLA, Petr NEUWIRTH, Zdeněk KREJÍK, Kamil ZÁRUBA a Pavel MARTÁSEK. *Nanomedicína - současný stav a perspektivy: velký potenciál nebo jen módní slogan?*. *Chemické listy*. 2005, 100: 4-9.
9. HOUBOVÁ, Jana, Markéta VACULOVIČOVÁ a René KIZEK. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies: Liposomální transportéry*. 2014, (1), 6-9.
10. MORITZ, Michal a Malgorzata GESZKE-MORITZ. *Application of nanomaterials in medical sciences*. *Chemik*. 2012, 2012(66), 219-226.

11. DESAI, TA, WH CHU, JK TU, GM BEATTIE, A HAYEK a M FERRARI. Microfabricated immunoisolating biocapsules. *Biotechnol Bioeng.* 1998, (57), 118-120.
12. HOOD, JL, RS SAN a SA WICKLINE. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011, (71), 92-801.
13. ZHUANG, X, X XIANG, W GRIZZLE, D SUN, S ZHANG, RC AXTELL a kol. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011, 19(17), 69-79.
14. SUNDARAY, B, V SUBRAMANIAM, TS NATRAJAN a kol. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl Phys Lett.* 2004, 84(122), 2-4.
15. LI, D, G OUYANG, JT MCCANN a kol. Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes. *Nano Lett.* 2005, 5(9), 13-16.
16. BERNDT, P, GB FIELDS a M TIRRELL. Synthetic lipidation of peptides and amino acids: monolayer structure and properties. *J Am Chem Soc.* 1995, 117(95), 15-22.
17. YC Yu, P BERNDT, M TIRRELL a kol. Self-assembling amphiphiles for construction of protein molecular architecture. *J Am Chem Soc.* 1996, 118(125), 15-20.
18. HARTGERINK, JD, E BENIASH a SI STUPP. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self assembling materials. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(513), 3-8.
19. YC Yu, M TIRRELL a GB FIELDS. Minimal lipidation stabilized protein-like molecular architecture. *J Am Chem Soc.* 1998, 120(99), 79-87.
20. STUPP, SI, V LEBONHEUR a K WALKER. Supramolecular materials: self-organized nanostructures. *Science.* 1997, 275(384), 4-9.



21. HARTGERINK, JD, E BENIASH a SI STUPP. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*. 294(168), 4-8.
22. MA, PX a R ZHANG. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. 1999, 46, 60-72.
23. ZHANG, R a Px MA. Methods of tissue engineering: Processing of polymer scaffolds: phase separation. *San Diego: Academic*. 2002, 715, 24.
24. AMPAOLESI a P NEUENSCHWANDER. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*. 26(460), 6-15.
25. MIN, BM, G LEE a SH KIM. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2004, 25(12), 89-97.
26. KHIL, MS, DI CHA a HY KIM. Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*: 67. 2003, 67, 5-9.
27. MO, X a HJ WEBER. Electrospinning P(LLA-CL) nanofiber: a tubular scaffold fabrication with circumferential alignment. *Macromol Symp*. 2004, 217(41), 13-16.
28. XU, CY, R INAI a M KOTAKI. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*. 2004, 25(8), 77-86.
29. BOLAND, ED, JA METTHEWS a KJ PAWLOWSKI. Elektrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Front Biosci*. 2004, 9(14), 22-32.