

**BIONANOTECHNOLOGIE  
NANOBIOTECHNOLOGIE  
NANOMEDICÍNA**

**Tasilo Prnka  
Karel Šperlink**

**červenec 2006**

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>4</b>
<b>2. MOLEKULÁRNÍ BIOTECHNOLOGIE</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Biovýroba</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Monoklonální protilátky</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Buněčné kultury</b>	<b>7</b>
2.3.1. Buněčné kultury rostlin	7
2.3.2. Buněčné kultury hmyzu	7
2.3.3. Buněčné kultury savců	7
<b>2.4. Technologie rekombinace DNA</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Klonování</b>	<b>8</b>
2.5.1. Molekulární klonování	9
2.5.2. Buněčné klonování	9
2.5.3. Klonování zvířat	9
<b>2.6. Proteinové inženýrství</b>	<b>9</b>
<b>2.7. Biosenzory</b>	<b>10</b>
<b>2.8. Otisky DNA (fingerprinting)</b>	<b>10</b>
<b>3. NANOTECHNOLOGIE</b>	<b>11</b>
<b>4. BIOTECHNOLOGIE → NANOTECHNOLOGIE</b>	<b>13</b>
<b>4.1. Lekce z přírody – molekulární biologie</b>	<b>13</b>
<b>4.2. Biologické stavební částice</b>	<b>14</b>
4.2.1. Nukleové kyseliny (DNA, RNA)	17
4.2.2. Proteiny a peptidy	22
4.2.3. Lipidy	26
4.2.4. Polysacharidy	28
<b>4.3. Biologické nano- a mikrostruktury</b>	<b>30</b>
4.3.1. Strategie vytváření struktur na molekulární úrovni	30
4.3.2. Biologické prostředí v nanorozměrech	33
4.3.3. Hierarchické uspořádání	34
4.3.4. Biomineralizace	36
4.3.5. Biologické membrány	40
4.3.6. Molekulární kanály a pumpy	42
4.3.7. Molekulární motory	42
4.3.8. Molekulární továrna – buňka	45
4.3.9. Aplikace biomolekul a biosystémů v nanotechnologiích – bionanotechnologie	49
<b>5. NANOTECHNOLOGIE → BIOTECHNOLOGIE, BIOFARMACIE A MEDICÍNA</b>	<b>71</b>
<b>5.1. Moderní zobrazovací a analytické metody a přístroje</b>	<b>72</b>
5.1.1. Optické zobrazování a analýza	73
5.1.2. Elektronová mikroskopie a analýza	84
5.1.3. Mikroskopie skenující sondou	88
5.1.4. Rtg. diagnostika a nukleární zobrazování	91
5.1.5. Lékařská sonografie	95
5.1.6. Vybrané molekulárně – biologické analytické techniky	96
<b>5.2. Nanobiosenzory</b>	<b>105</b>
5.2.1. Senzory s nosníkovým uspořádáním	105
5.2.2. Senzory na bázi nanotubic	107
5.2.3. Senzory na bázi nanodrátů	109
5.2.4. Bio-bar Code (biologický čarový kód)	109
<b>5.3. Nanomateriály</b>	<b>111</b>
5.3.1. Nanočástice pro biomolekulární diagnostiku	111
5.3.2. Uhlíkové nanomateriály	121

5.3.3.	Nanočástice hydroxyapatitu (nanoHAP)	129
5.3.4.	Nanočástice stříbra	130
5.3.5.	Dendrimery	131
5.3.6.	Ormosily	133
5.3.7.	Polymerní nanovlákná	133
5.3.8.	Nanoporézní materiály	134
5.3.9.	PEG – poly(etylen glykol)	134
<b>5.4.</b>	<b>Biotechnologie, farmacie a nanotechnologie</b>	<b>135</b>
5.4.1.	Příspěvek biotechnologií k farmakologii a farmacii	137
5.4.2.	Současná praxe při objevování léků	139
5.4.3.	Stručný popis postupu pro objevování nových léků	141
5.4.4.	Možnosti aplikace mikro- a nanotechnologií	145
5.4.5.	Cílená doprava léků do organismu	147
<b>5.5.</b>	<b>Nanomedicína</b>	<b>156</b>
5.5.1.	Přehled oblastí nanomedicíny	156
5.5.2.	Zobrazovací a diagnostické metody a zařízení	156
5.5.3.	Tkáňové inženýrství	161
5.5.4.	Přínos nanotechnologií k terapii rakoviny	167
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>176</b>

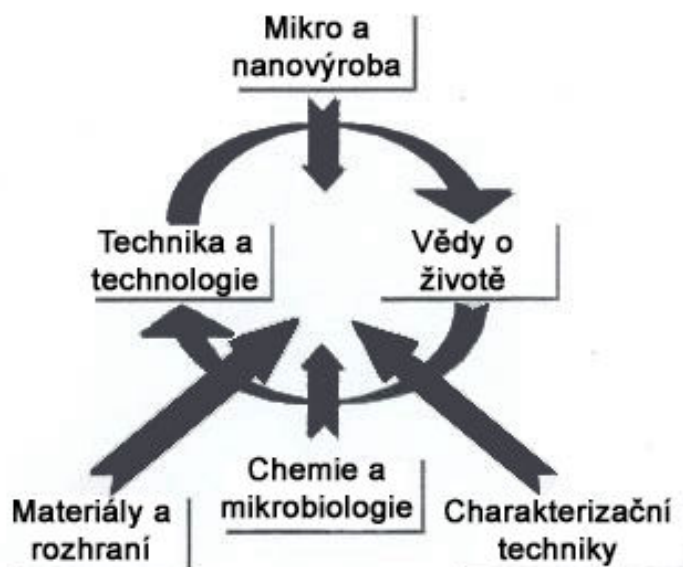
# 1. ÚVOD

Nanotechnologie je oblast s širokou škálou mezivědních činností, které mohou být využity velmi různě, například v optoelektronice, mikrofluidice i v lékařství. Jednou z nejvýznamějších interdisciplinárních sfér, která začíná nyní sklízet plody ze své činnosti, je rozhraní mezi biologickými vědami a nanotechnologií. Konvergence biologických věd a nanotechnologií je doménou nanobiotechnologie či bionanotechnologie. V této publikaci používáme obou výrazů. **Nanobiotechnologie** je definována jako oblast, která používá principů a technik nanotechnologie pro porozumění biosystémům (živým či neživým) a pro jejich přeměnu. **Bionanotechnologie** pak využívá poznatků ze zkoumání živé přírody, principy z oblasti biologie a biomateriálů k vytváření nových přístrojů a systémů v nanorozměrech a dalších rozměrových škálách.. V příštím desetiletí se očekává, že dojde ke zrychlení integrace nanotechnologií s biotechnologiemi a rovněž i s informačními technologiemi s kognitivními vědami<sup>1</sup>.

Oblast nanobiotechnologií (bionanotechnologií) zahrnuje především:

- biologické a chemické systémy, od molekulární k buněčné úrovni
- materiály a technologie, které ovlivňují jak biologický, tak syntetický svět
- vytváření a charakterizaci hybridních bio-elektronických a dalších systémů
- technologie nanovýroby

Představa nanobiotechnologie (bionanotechnologie) je znázorněna na **obr. č. 1**. Do základního kruhu vzájemně se ovlivňujících věd o živé přírodě, inženýrství a technologie vstupují vědní a technologické oblasti jako mikro- a nanovýroba, materiály a rozhraní (povrchy), chemie a mikrobiologie, charakterizační techniky.



**Obr. č. 1** Sféra nanobiotechnologie (bionanotechnologie)

<sup>1</sup> „Konvergující technologie – utváření budoucnosti evropské společnosti“, příručka č. 1 V. řady, vyd. ČSNMT/Repronis, 10/2005, ISBN 80-7329-103-7

Od aplikací výsledků výzkumu v oblasti nanobiotechnologie (bionantechologie) se očekává významný pokrok v mnoha důležitých oborech, např.:

- **Aplikace v medicíně** zahrnují např. miniaturizované diagnostické metody, které by mohly být použity ke včasnému rozpoznávání chorob a stavu organismu. Nanotechnologické povrchy mohou zlepšit bioaktivitu a biokompatibilitu implantátů. Samoorganizující se struktury otevírají cestu pro nové generace tkáňových technologií a pro biomimetické materiály a poskytují dlouhodobou perspektivu pro syntetické transplantace orgánů. Vyvíjejí se zcela nové systémy pro podávání léků. Nedávno se podařilo transportovat nanočástice do buněk tumoru s cílem jeho likvidace ohřevem.
- **Výzkum potravin, vody a životního prostředí** se rozvíjí využitím bionantechologie zejména při zjišťování a neutralizaci přítomnosti mikroorganismů nebo pesticidů. Původ potravin by mohl být sledován pomocí nového způsobu miniaturizovaného „značkování“. Vývoj nanotechnologických (např. fotokatalytických) technologií pro odstraňování škodlivin by mohl významně pomoci při odstraňování škod v životním prostředí (např. znečištění vod nebo půdy ropnými produkty).
- **Bezpečnost** by mohla být zvýšena např. inovovanými systémy rozpoznávání s vysokou přesností a včasným upozorněním na biologické nebo chemické látky již na úrovni jednotlivých molekul
- V dlouhodobé perspektivě by mohly molekulární nebo **biomolekulární nanoelektronika**, spintronika nebo kvantové počítání ukázat nové cesty, které překonají současné počítačové technologie.

V příručce jsou populární formou stručně charakterizovány nejprve oblasti molekulární biotechnologie a nanotechnologie a poté jejich vzájemná interakce, tj. jak biotechnologie (a zkoumání živé přírody) ovlivňují nanotechnologie a jak nanotechnologie ovlivňují biotechnologie. V závěru je věnována pozornost využití nanotechnologií v medicíně.

## 2. MOLEKULÁRNÍ BIOTECHNOLOGIE

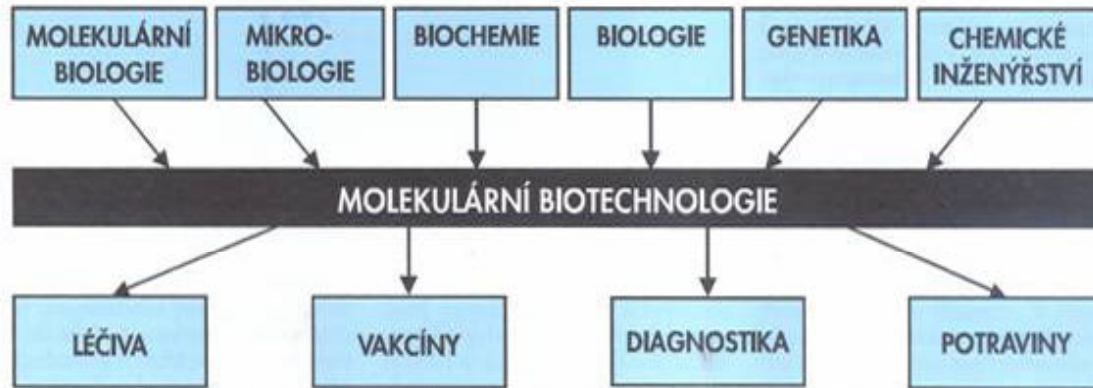
Z mnoha definic biotechnologie se zdá být nejužitečnější ta, jež byla formulovaná Evropskou biotechnologickou federací (EFB): „**Biotechnologie** je jakákoliv technologie, která využívá biologické systémy, živé organizmy nebo jejich části k výrobě nebo modifikaci produktů, ke šlechtění rostlin a živočichů nebo mikroorganismů pro specifická použití“<sup>2</sup>. Obor rozvíjí základní poznatky z **biologie**<sup>3</sup>. Biotechnologie je prastaré odvětví, jehož kořeny sahají až do období 8000 let před naším letopočtem, kdy lidé domestikovali plodiny a hospodářská zvířata. Poprvé byl výraz biotechnologie použit až v roce 1919<sup>4</sup>. V šedesátých a sedmdesátých letech minulého století umožnily naše znalosti biologie a nové analytické a diagnostické metody záměrně používat v biotechnologii nejmenší částice organismů – jejich

<sup>2</sup> Vodrážka Z.: „Biochemie“, Academia, Praha, 2002, ISBN 80-200-0600-1, 3.kniha, str. 151

<sup>3</sup> **Biologie** je vědní obor ze skupiny přírodních věd, zabývající se zkoumáním organismů od molekulární úrovně, přes výzkum buněk, tkání, orgánů až po samotného jedince. Mezi podřízené a související vědní obory můžeme zařadit: biochemii, biofyziku, biotechnologie, molekulární biologii, mikrobiologii, buněčnou biologii, genetiku, virologii, anatomii, ekologickou biologii, evoluční biologii, imunologii, strukturální biologii, fyziologii, botaniku, zoologii, mykologii, radiobiologii, matematickou biologii, antropologii, funkční genomiku a proteomiku, hydrobiologii, cytogenetiku, bioniku, lékařské disciplíny, bioinformatiku a další specializované vědní disciplíny.

<sup>4</sup> [www.bio.org/timeline/timeline.html](http://www.bio.org/timeline/timeline.html)

buňky a biologické molekuly. Začalo období moderní biotechnologie, často nazývané **molekulární biotechnologie**, vycházející především z molekulární a buněčné biologie, genetiky a řady dalších oborů – **obr. č. 2**. Můžeme ji definovat jako „používání buněčných a biomolekulárních procesů pro řešení problémů nebo vytváření užitečných výrobků“. Molekulární biotechnologie patří v současné době k nejvíce



**Obr. č. 2** Oblasti vstupující do molekulární biotechnologie

se rozvíjejícím odvětvím a má významný přínos pro bezpečnost a kvalitu života, jakož i udržitelný rozvoj.

Uplatnění postupů molekulární biotechnologie je velmi rozsáhlé. Uplatňuje se zejména:

- ve farmaceutickém průmyslu
- v humánní a veterinární medicíně
- v chemickém a potravinářském průmyslu
- v zemědělství a lesnictví
- v ochraně životního prostředí
- v energetice
- v těžbě minerálů
- atd.

Uvedeme několik příkladů biotechnologií, které využívají buňky a biologické molekuly.

## 2.1. BIOVÝROBA

Nejstarší z biotechnologií, biovýroba (biozpracování, bioprocessing), využívá pro výrobu a zpracování chemických látek živé buňky nebo biomolekuly. Používané živé buňky jsou obvykle jednobuněčné mikroorganismy, jako např. kvasnice nebo bakterie. Jako biomolekulární komponenty se nejvíce používají enzymy, což jsou proteiny katalyzující biochemické reakce. Biovýroba využívá řadu biologických postupů, od fermentačních procesů k výrobě piva a vína až po moderní postupy výroby speciálních chemikálií jako jsou enzymy, aminokyseliny, biokatalyzátory, vitamíny, průmyslová rozpouštědla, pigmenty, pesticidy, léčiva atd. Souběžně s evolucí biotechnologie se biovýroba modernizovala, když byly odkryty molekulární principy buněčných procesů. Dnes se např. používá mikrobiální fermentace ve spojení s technologií rekombinace DNA<sup>5</sup> k výrobě výrobků jako jsou lidský inzulín, telecí enzym užívaný při výrobě sýrů, biodegradabilních plastů, detergentních enzymů pro prádelny a vakcíny pro žloutenku typu B.

<sup>5</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, ISBN 80-902905-0-4, str. 325.

## 2.2. MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Technologie monoklonálních protilátek<sup>6</sup> používá imunitní systém buněk vytvářející proteiny nazývané protilátky. Všichni máme zkušenosti s výjimečnou specifičností protilátek. Ty, které napadají chřipkový virus jednu zimu, nejsou účinné proti poněkud pozměněnému viru příští rok. Specifičnost protilátek zde znamená, že biologické molekuly se váží jen k jednomu druhu molekuly. Tato vlastnost protilátek z nich však vytváří účinný diagnostický nástroj. Jsou schopny vypátrat látky, které se vyskytují v nepatrných objemech a analyzovat je s velkou přesností. Monoklonální protilátky se používají např. pro zjištění nečistot v životním prostředí, detekci škodlivých mikroorganismů ve potravinách, k rozlišení rakovinných buněk od zdravých, k rychlé diagnóze infekčních chorob lidí, zvířat a rostlin. Monoklonální protilátky jsou rovněž velmi specifické terapeutické sloučeniny. Spojené s toxiny mohou selektivně dopravit chemoterapeutickou látku k rakovinným buňkám a současně nepoškodit zdravé buňky. Byly vyvinuty monoklonální protilátky pro překonání odmítavé reakce transplantovaného orgánu a léčení autoimunitních<sup>7</sup> chorob atd.

## 2.3. BUNĚČNÉ KULTURY

Technologie buněčných kultur je růst buněk mimo živý organizmus. Rozeznáváme buněčné kultury rostlin, hmyzu a savců.

### 2.3.1. Buněčné kultury rostlin

Buněčné kultury rostlin jsou environmentálně příznivá a ekonomicky přiměřená alternativa získávání přírodních výrobků vhodných pro léčení. Příkladem je např. nový chemoterapeutický prostředek paclitaxel, látka nalezená v tisech. Buněčné kultury rostlin jsou rovněž důležitým zdrojem látek používaných ve voňavkách, barvách a vůních v potravinářském průmyslu.

### 2.3.2. Buněčné kultury hmyzu

Buněčné kultury hmyzu mohou rozšířit používání biologických látek, které zabíjí hmyzí škůdce bez ohrožení prospěšného hmyzu nebo omezit hromadění pesticidů v prostředí. I když jsou známy výhody biologické ochrany mnoho desetiletí, výroba prostředků biologické ochrany ve větších množstvích nebyla doposud možná. Buněčné kultury hmyzu překonávají tato výrobní omezení. Navíc, jako u buněčné kultury rostlin, buněčné kultury hmyzu jsou zkoumány jako výrobní technologie léčivých proteinů.

### 2.3.3. Buněčné kultury savců

Při chovu dobytka se již po desetiletí používají buněčné kultury savců. Vajíčka a spermie odebrané z geneticky kvalitních býků a krav jsou spojovány v laboratoři a výsledná embrya se vyvíjejí v kulturách, než jsou implantována do náhradních krav. Podobná metoda je podstatnou částí lidského procesu oplodnění *in vitro*. V poslední době se používání buněčných kultur savců podstatně rozšířilo, např. se tak vyrábějí monoklonální protilátky. Používají se léčebné postupy založené na kultivování dospělých kmenových buněk.<sup>8</sup> Z kmenových buněk, které se vyskytují v některých tkáních, vznikají dělením další buňky, a to i různých typů. Příkladem tohoto jevu je proces krvetvorby (hematopoeza). Z jedné hematopoetické kmenové buňky, která se vyskytuje v kostní dřeni, se vytváří řada

<sup>6</sup> Monoklonální protilátka je produkt jediného klonu lymfocytů, tj. potomstva jedné buňky.

<sup>7</sup> Autoimunitní choroba – choroba, kdy tělo vytváří protilátky proti vlastním tkáním

<sup>8</sup> Kmenové buňky jsou prekurzory diferenciováných buněk

specializovaných buněk, které dělením dávají vznik zralým krevním buňkám nacházejícím se v krevním oběhu (červené krvinky, bílé krvinky, lymfocyty atd.)<sup>9</sup>. Tento postup se stal základem léčení leukémie u lidí pomocí transplantace kostní dřeně. Většina tkání však neprodukuje plynule kmenové buňky, které by mohly být zdrojem zdravých buněk. Probíhá rovněž výzkum tzv. embryonálních kmenových buněk, které by mohly být zdrojem zdravých buněk v tkáních, které nemají vlastní kmenové buňky. Takové buňky by mohly být použity pro léčení např. Parkinsonovy nebo Alzheimerovy choroby, případně při rekonstrukci tkání po úderech nebo po infarktu myokardu.

## 2.4. TECHNOLOGIE REKOMBINACE DNA

Technologie rekombinace<sup>10</sup> DNA je jedna z technik genetických modifikací. Uplatňuje se v přírodě i v umělých podmínkách. Je to proces, ve kterém jsou chromozomy nebo molekuly DNA rozštěpeny a jejich fragmenty jsou znovu spojeny novým způsobem. Rekombinace DNA se vytváří kombinováním genetického materiálu z různých zdrojů.

Lidé začali přednostně kombinovat genetický materiál domestikovaných plodin a zvířat již před tisíci léty, když prováděli selekci jednotlivců vhodných pro reprodukci. Selektivní pěstování plodin a zvířat doznalo velkého rozsahu po objevu genetické podstaty dědičnosti počátkem 20. století. V současné době se mimo selektivní šlechtění kombinují geny na molekulární úrovni při používání přesných metod rekombinace DNA. Oba přístupy si jsou navzájem podobné, avšak existují významné rozdíly:

- Genetické modifikace umožňují přenos jednoho genu, jehož funkci známe, z jednoho organismu do druhého
- Při selektivním šlechtění jsou přenášeny mezi organismy velké skupiny genů neznámých funkcí

V současné době se používají technologie rekombinace DNA ve spojení s molekulárním klonováním zejména pro:

- Výrobu nových léků a bezpečnějších vakcín
- Léčení některých genetických chorob
- Kontrolu virových onemocnění
- Zamezení zánětů
- Zvýšení zemědělských výnosů a snížení výrobních nákladů
- Zlepšení nutričních hodnot potravin
- Snížení znečištění vody a vzduchu
- Omezení kažení potravin
- Vývoj a výrobu biodegradabilních plastů

## 2.5. KLONOVÁNÍ

Technologie klonování umožňuje vytvoření populace geneticky identických molekul, buněk, rostlin a některých zvířat.

---

<sup>9</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, ISBN 80-902905-0-4, str. 617

<sup>10</sup> **Rekombinace** je soubor přírodních procesů a laboratorních postupů, které umožňují přeuspořádání genů nebo jejich částí a zavádění genetické informace z jednoho nebo několika organismů do jiného individua.



### 2.5.1. Molekulární klonování

Molekulární neboli genové klonování je technologie vytváření geneticky identických molekul DNA. Slovo „klonovat“ se stalo synonymem pro vložení nové části DNA do existující molekuly DNA. Molekulární klonování stojí u základů revoluce molekulární biologie a je základním a podstatným nástrojem biotechnologického výzkumu, vývoje i aplikací. Prakticky všechny aplikace technologie rekombinace DNA, od „Projektů lidského genomu“ k farmaceutické výrobě, k výrobě transgenních plodin, závisejí na molekulárním klonování.

### 2.5.2. Buněčné klonování

Při buněčném klonování se vytvářejí řady identických buněk. Je to rovněž důležitý nástroj biotechnologického výzkumu, vývoje a aplikací. Všechny aplikace jsou založeny na výrobě geneticky identických kopií buněk. Příklady: léčba a diagnostika používá technologii monoklonálních protilátek, regenerace transgenních rostlin vychází z jedné buňky, farmaceutická výroba je založena na buněčných kulturách savců a vytvářejí se terapeutické buňky a tkáně (terapeutické klonování).

### 2.5.3. Klonování zvířat

Klonování zvířat, které bylo významným nástrojem výzkumu v padesátých letech minulého století, napomohlo před 20 – 30 léty k rychlému zlepšení stavu chovných stád. V roce 1997 byla klonováním vytvořena ovce Dolly, což mělo značnou odezvu ve veřejnosti. Nebyl to první klon zvířete, ale v případě Dolly to bylo poprvé, kdy se pro klonování použila dospělá a nikoliv embryonální buňka, což byl vědecký průlom.

Technologie rekombinace DNA, ve spojení s klonováním zvířat, nám poskytuje vynikající zvířecí modely pro studium genetických chorob, stárnutí a rakoviny a v budoucnu by mohla pomoci při objevování léků a hodnocení nových léčebných metod, jako např. při genetické a buněčné terapii. Klonování zvířat poskytuje zoologům nástroj pro zachraňování ohrožených druhů.

## 2.6. PROTEINOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Proteinové<sup>11</sup> (bílkovinné) inženýrství je postup vytváření nových proteinů takovou změnou struktury přírodních proteinů, aby získaly nové vlastnosti. Vzniklo na začátku 80. let minulého století. Technologie proteinového inženýrství se často používají ve spojení s technologií rekombinace DNA pro zlepšení vlastností existujících proteinů, jako např. enzymů, protilátek a buněčných receptorů<sup>12</sup>, a též pro vytváření proteinů, které se nenacházejí v přírodě. Proteiny se používají k vývoji léků, zpracování potravin a v průmyslové výrobě. V současné době se proteinové inženýrství nejvíce prosazuje při aplikacích, kdy se při vývoji ekologicky udržitelných výrobních postupů mění katalytické vlastnosti enzymů. Enzymy jsou proteiny, které jsou z hlediska vztahu k životnímu prostředí optimálními biokatalyzátory, protože se rozpouštějí ve vodě, nejlépe pracují při neutrálním pH a při poměrně nízkých teplotách. Z těchto a dalších příznivých vlastností enzymů – biokatalyzátorů těží dnes výroba v chemickém, textilním, papírenském, potravinářském průmyslu a dalších odvětvích<sup>2</sup>.

Ve výzkumu léků se proteinové inženýrství uplatňuje při vývoji nových proteinů, které se mohou vázat na viry a deaktivovat je a na geny zapříčiňující nádory. Mohou rovněž vytvářet

---

<sup>11</sup> **Protein** (bílkovina) je makromolekulární látka (biopolymer) s relativní molekulovou hmotností více než 10000, vytvořená z aminokyselin vázaných peptidickými vazbami.

<sup>12</sup> **Receptor** (target) – molekula uvnitř buňky nebo na jejím povrchu, ke které se může selektivně vázat nějaká látka (hormon, lék), což způsobí změnu aktivity buňky

účinné vakcíny. Při výzkumu potravin se proteinové inženýrství používá při zlepšení jejich skladování a při vývoji nových proteinů jako látek napomáhajících při výrobě želatiny.

## 2.7. BIOSENZORY

Technologie biosenzorů spojuje poznatky biologie s pokroky v mikroelektronice. Biosenzor sestává obvykle ze tří částí: biologického prvku, např. buňky, enzymu, DNA nebo protilátky, rozhraní a převodníku velmi malých rozměrů. Biologický prvek specificky detekuje přítomnost látky, která má být zjištěna, rozhraní (polymerový tenký film, chemicky modifikovaný povrch) spojuje biologický prvek s převodníkem. Převodník, přeměňující biochemický signál na elektrický nebo optický, úměrný koncentraci detekované látky, je zařízení, které je napájeno jedním systémem a které napájí druhý systém energií, obvykle jiné formy. Biosenzory mohou např.:

- Měřit nutriční hodnotu, čerstvost a bezpečnost potravin
- Zabezpečovat činnost výzkumníků při práci s živými krevními organizmy
- Měřit a lokalizovat nečistoty v životním prostředí
- Detekovat a kvantifikovat výbušné látky, toxiny a biologické zbraně

Biosenzory jsou v současné době převážně ve vývoji. Biologické prvky biosenzorů jsou předmětem rozsáhlého výzkumu. Hlavním problémem jsou optimální technologie výroby biologického prvku, které zajistí reprodukovatelnost jeho vlastností a řada technických problémů: malá adheze polymerového filmu k převodníku a z toho plynoucí malá spolehlivost, problémy s miniaturizací biosenzorů, jejich citlivostí, omezení šumů atd. Není doposud vytvořena spolehlivá a rychlá nedestruktivní kontrola kvality biosenzorů.

## 2.8. OTISKY DNA (fingerprinting)

DNA otisky je biotechnologická technologie, která výrazně zlepšila možnosti kriminalistického pátrání, soudního lékařství, antropologie a dalších odvětví. Pro namnožení konkrétní nukleotidové sekvence obsažené v jakékoliv DNA se nyní používá metody PCR (polymer chain reaction – polymerová řetězová reakce). Principem DNA otisků jsou genetické rozdíly mezi jednotlivci nebo organizmy. Každý žijící subjekt (s výjimkou identických dvojčat, trojčat atd.) je geneticky unikátní. DNA otisky se zaměřují na nejmenší možné rozdíly v DNA sekvenci, které mohou existovat – rozdíly v sekvenci čtyř základních molekul (nukleotidů) DNA.

DNA otisky jsou dnes nejmocnější a nejznámější aplikací biotechnologie. Porovnávají se různé druhy tkání v transplantovaných orgánech, zjišťuje se přítomnost specifických mikroorganismů, vybírají se vhodné geny při šlechtění rostlin, určuje se rodičovství, identifikují se části těl jednotlivců, zkoumají se fosílie atd.

Velkým úspěchem použití metody byly např. práce na rekonstrukci fragmentů „Zápisků od Mrtvého moře“, které byly psány na ovčí kůži. Fragmenty mohly být odděleny od mladších, které byly psány na kozí kůži. Jiným úspěchem byla identifikace ostatků cara Nikolaje Romanova II, který byl popraven bolševiky v roce 1918. DNA ostatků byla porovnána s DNA žijících potomků, např. britského Prince Filipa. Otevírají se staré soudní případy a leckdy se na základě výsledků DNA otisků propouštějí z vězení nesprávně odsouzené osoby.

### 3. NANOTECHNOLOGIE

**Nanotechnologie** jsou skupina intenzivně se rozvíjejících se oborů, které využívají pozoruhodného pokroku v technologii kontroly struktury materiálů v rozměrech, jež se blíží velikosti jednotlivých molekul a jejich organizovaných celků nebo supramolekulárních struktur. Nanometrické délkové měřítko v zásadě vytváří možnosti pro nové materiály, které lze využít ke konstrukci zařízení a systémů. Nanotechnologie obvykle odlišujeme od nanovědy, která takovou technologii umožňuje. **Nanověda** je v podstatě výzkum jevů a materiálových vlastností na nanometrické úrovni. Jsou to vědní oblasti na průsečíku fyziky pevné fáze, chemie, inženýrství a molekulární biologie. Nanotechnologie využívají získané vědomosti a znalosti k vytváření nových materiálů a struktur s novými a leckdy neobvyklými vlastnostmi.

Oblast **nanosvěta** leží mezi světem atomů a současným reálným světem. Je to území částic a struktur v rozměrovém oboru od cca 1 nm do cca 100 nm, které nebylo v minulosti středem přílišné pozornosti. **Nanostruktury**, které jsou základními prvky **nanomateriálů**, jsou dostatečně malé na to, aby se v nich mohly uplatňovat kvantové jevy. Jsou však i tak rozměrné, že aplikace zákonů kvantové mechaniky při zkoumání jejich vlastností nemá význam. Dnes rozumíme individuálními vlastnostem atomů, ale prozatím málo rozumíme tomu jak se chovají jejich seskupení a tomu, jak vznikají jejich někdy neočekávané vlastnosti. V současné době však nejde jen o poznání a charakterizování jevů, které se v nanosvětě projevují, ale i o praktické využití nových a neobvyklých vlastností nanomateriálů, **nanosystémů a nanozařízení**, které se snažíme cílevědomě vytvářet a spojovat je s objekty větších rozměrů.

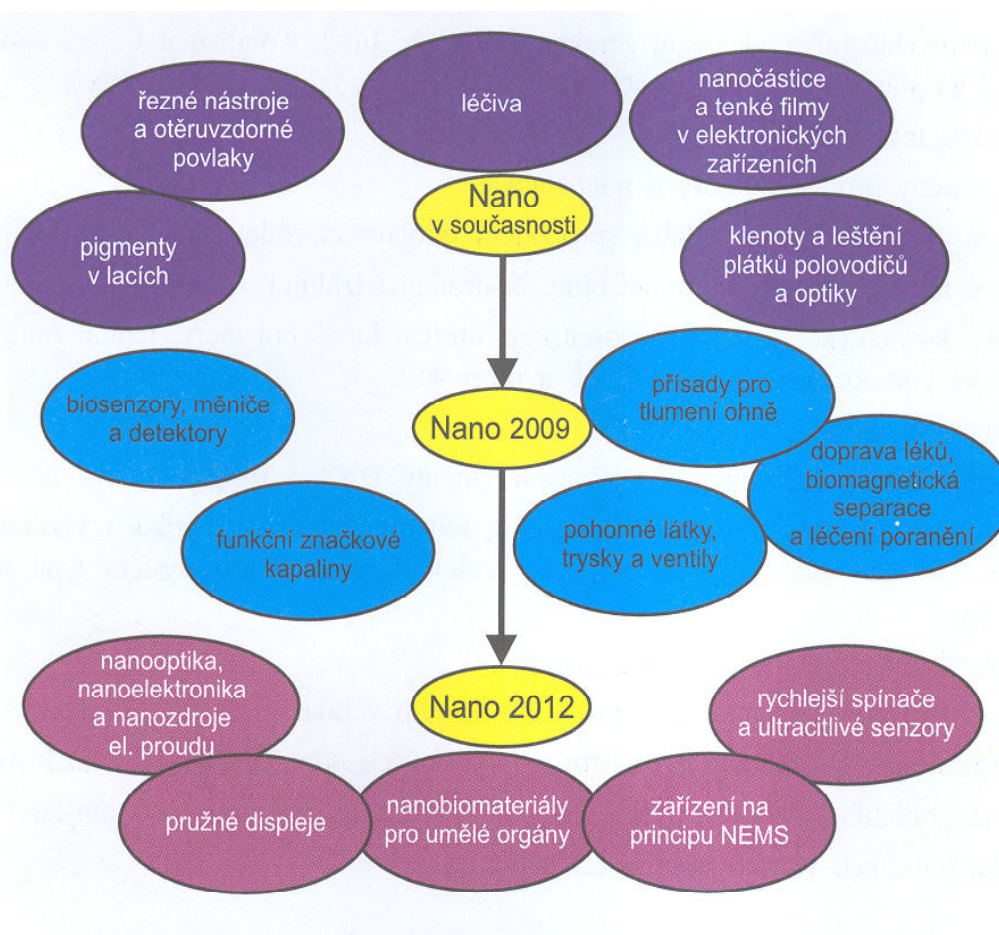
**Nanotechnologie** jsou interdisciplinární a průřezové technologie. Rozvíjí se v řadě oblastí, např.:

- Oblast **nanomateriálů** je zaměřena na zkoumání a vývoj nových druhů materiálových systémů, jejichž podstatné vlastnosti vyplývají z rozměrů jejich složek v nanometrech.
- **Nanochemie** se zabývá vytvářením a modifikací chemických systémů, jejichž funkčnost pramení z jejich nanorozměrů. Supramolekulární funkční systémy představují materiálový základ nových látek.
- **Nanoelektronika** zkoumá různé strategie využití elektronických vlastností nanostruktur v celé řadě aplikací budoucích informačních technologií.
- **Nanooptika (nanofotonika)** pokládá základy optických vysokorychlostních komunikačních technologií, nových zdrojů laserového světla a optických systému pro široká použití.
- **Nanovýroba** zkoumá a vyvíjí metody technologie výroby struktur, vrstev a systémů v nanorozměrech.
- **Nanobiotechnologie (bionanotechnologie)** se zabývají využitím biologických nanosystémů v technických systémech, od sensorové technologie po fotovoltaika. Používají též nanotechnologické postupy při zkoumání biologických systémů, z čehož budou mít velký prospěch zejména oblasti lékařské techniky a molekulární diagnostiky.
- **Nanoanalytika** rozvíjí analytické metody a nástroje pro zkoumání a pochopení základních jevů a pro charakterizování výrobků. Objev skenovacího tunelovacího mikroskopu (STM) a mikroskopu atomových sil (AFM) v osmdesátých letech minulého století odstartoval rozvoj nanovědy a nanotechnologií.

Vědecké zkoumání nanotechnologií – **nanověda** – je již velmi intenzivní, zatímco praktická aplikace výsledků vědeckého bádání je v počátcích. Jsou však oblasti, ve kterých jsou aplikace nanotechnologií již do určité míry rozvinuty, v jiných oblastech se průnik nanotechnologií teprve očekává. Některé současné aplikace nanotechnologií a předpokládaný vývoj je zřejmý z **obr. č. 3**.

Probíhající výzkum nových jevů a procesů v nanometrické škále poskytuje vědě řadu nástrojů, materiálů, zařízení a systémů s unikátními vlastnostmi. Nové vlastnosti a možnosti nanostrukturních materiálů, nanozařízení a nové výrobní postupy již způsobily obrovskou aktivitu ve vědě a výzkumu, ale i značný zájem průmyslu, pro očekávané velmi perspektivní a mnohdy revoluční potenciální aplikace v elektronických přístrojích, automobilových pohonných jednotkách, průmyslové katalýze, kosmetice atd.

Používání pojmu „nanotechnologie“ je prozatím do značné míry omezeno na umělé nanostruktury polovodičů, kovů, keramiky a plastů. Na druhé straně, většinu oblastí biologie můžeme považovat za formu nanotechnologií, protože molekulární stavební jednotky života (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy, uhlohydráty atd.) jsou příklady materiálů majících zvláštní výjimečné vlastnosti vyplývající z jejich rozměrů, způsobu jejich vytváření a funkcí v nanorozměrech. Z biologie může čerpat technický svět elektroniky, počítačů, materiálového inženýrství a technologií výroby poznatky jak sestavovat komplexní funkční zařízení a systémy, které mohou pracovat na molekulární úrovni a jak se ukazuje, naopak nanotechnologie obohatí biotechnologie, včetně medicíny, o nová technická řešení a materiály.



**Obr. č. 3** Současné aplikace nanotechnologií a předpokládaný vývoj

## 4. BIOTECHNOLOGIE → NANOTECHNOLOGIE

Biologické a fyzikální vědy sdílejí společný zájem o malé struktury. Výměna informací přes hranice obou vědních oblastí se projevila v oblasti nových materiálů a vědeckých nástrojů zkoumání (převážně v oblasti fyzikálních věd) a ve studiu nových jevů (převážně v oblasti biologických věd). Nanotechnologie nabízí biologii nové nástroje zkoumání a biologie nabízí nanotechnologii přístup k novým druhům funkčních nanosystémů – komponentám buněk – které jsou extrémně zajímavé a zřejmě i užitečné. Je třeba poznamenat, že příspěvek biologie není jen „nano“, ale zahrnuje struktury mající široký rozsah rozměrů. Rozsah rozměrů zahrnující „nano“, „mikro“ či zjednodušeně „malé“ struktury je důležitý, protože struktury nezbytné pro život buněk mají velikosti od malých molekul k strukturám o velikosti milimetrů. Biologické struktury jsou svým hierarchickým uspořádáním vzorem pro propojování umělých nanostruktur do rozměrnějších celků. Znalost struktury buněk a procesů v nich probíhajících jsou pro rozvoj nanotechnologií významné. Buňka je podstatou biologie – je to nejmenší jednotka, která je živá. Buňka je v podstatě prostor, v němž probíhá soustava chemických reakcí. Tyto reakce (katalyzované) se navzájem ovlivňují a spolu vytvářejí struktury s význačnými vlastnostmi jako jsou schopnost replikace, adaptace, zásobování energiemi atd., čemuž říkáme „život“<sup>13</sup>. **Porozumění biologickým procesům na úrovni nanometrů je silná hnací síla pro rozvoj nanotechnologií.**

### 4.1. LEKCE Z PŘÍRODY - MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Příroda byla odjakživa velkou inspirací pro lidstvo. Pokusy o napodobování přírody mají dlouhou historii. Leonardo da Vinci navrhoval létající stroje na základě studia letu ptáků, tvar hlavy stehenní kosti byl inspirací ke konstrukci Eiffelovy věže aj. V druhé polovině uplynulého tisíciletí se rozvinuly přírodní vědy a postupně bylo odhaleno mnoho přírodních zákonů a jevů, které se lidstvo snaží využít ke svému prospěchu. Souběžně se zkoumáním globálních přírodních jevů v makro - měřítkách se pozornost po vynálezu mikroskopu obrátila k neviditelnému světu a v druhé polovině minulého století jsme již mohli pozorovat jednotlivé atomy a molekuly a dokonce s nimi manipulovat. Rozvinula se **molekulární biologie**. Došlo k řadě zásadních objevů, vrcholících rozluštěním genetického kódu člověka. Studium přírodních jevů v měřítku nanometrů a mikrometrů doznalo velkého rozmachu. Zatím co dosavadní vědecká činnost nepřinesla odpověď na otázku „Co je život?“, protože nadále nevíme jak poraněný organizmus regeneruje přesně tutéž strukturu, jakou měl před poraněním nebo jak se vytvoří živý organizmus z vajíčka, mnoho dosažených výsledků bylo využito nebo se očekává, že bude využito v praktických oblastech jako jsou medicína, biotechnologie, materiálové inženýrství atd.

Hnací silou byla a je představa, že biologické koncepce, mechanismy, funkce a struktury mohou sloužit jako výchozí bod na cestě ke vývoji nových syntetických materiálů s novými vlastnostmi a nových technologií, především nanotechnologií. Všeobecně však není cílem imitovat biologické struktury či systémy (v podstatě to není zatím v lidských silách), ale použít získané znalosti jako návody k novým řešením.

Molekulární biologie se zabývá především studiem molekul v roztoku. V buňce jsou však molekuly často organizovány do funkčních agregátů, obvykle nanometrických rozměrů. Vizualizace a studium těchto struktur, zvláště mění-li se dynamicky během funkčních cyklů, je jednou z oblastí, kdy biologie využívá nástrojů nanotechnologií. V současné době je v této oblasti dosahováno značného pokroku.

---

<sup>13</sup> Whitesides G.M.: „The „Right“ Size in Nanobiotechnology“, Nature Biotechnology, 21, 2003, str. 1161.

Příkladem mohou být spektroskopická studia jedné molekuly nebo biofyzikální studium proteinových agregátů.

Molekula je z určitého hlediska konečná nanostruktura, základní stavební částice. Chemie nevyhnutelně dlouhodobě pracovala na ergodických hypotézách, tj., že průměrné chování jedné molekuly pozorované po dlouhou dobu je stejné jako chování souboru molekul. Citlivost analytických metod dříve umožňovala studium jen větších souborů molekul. Rychle rostoucí možnost pozorovat jednu molekulu při použití mikroskopie s velkým rozlišením a zkoumat fluktuace vlastností molekul v krátkých časech přineslo bohatství nových informací o dynamice molekul, zejména o jejich katalytických vlastnostech. Mikroskopie jedné molekuly je jedna z mnoha nových optických metod, které výrazně zlepšily rozlišitelnost při pozorování objektů. Konfokální mikroskopie, systémy pro pozorování v blízkém poli, vysoce citlivé Ramanovy spektroskopy a mikroskopy využívající totální vnitřní reflexe jsou příkladem pokroku světelné mikroskopie při pozorování nanostruktur.

V buňce pracuje množství molekulárních strojů – **biologických nanostrojů**. Jsou to např. ribozomy,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ATPázy, komplexy pro replikaci DNA, receptory membrán a fotosyntetická reakční centra. Uvedené struktury a bezpočet dalších, nacházejících se v buňce, jsou velmi komplexní a pracují podle plánu. **Slouží jako potenciální vzory budoucím lidmi vytvořeným nanostrojům**, i když prozatím není jasné zda využití přírodních technik bude možné. Je však skutečností, že biologické struktury, i když vykonávají leckdy podobné činnosti jako lidmi vytvořené stroje, využívají úplně jiných principů práce.

## 4.2. BIOLOGICKÉ STAVEBNÍ ČÁSTICE

Několik miliard let evoluce vedlo k vytvoření k ohromnému množství biologických organizmů. Tyto organizmy se vzhledem i vlastnostmi velmi odlišují, ale jejich důležitými stavebními prvky zůstávají chemické struktury nukleových kyselin, proteinů, lipidů a polysacharidů., které umožňují život. Hierarchické sestavování těchto základních prvků do pracujících biochemických strojů je základem buněčných funkcí. Mnohé z těchto „montážních“ procesů však probíhá v rozměrové škále, ve které je obtížné jejich zviditelnění a charakterizace. Významným cílem je proto detailní charakteristika struktury, a to nejen pro porozumění těmto procesům, ale i pro jejich pozdější využití v technologických aplikacích.

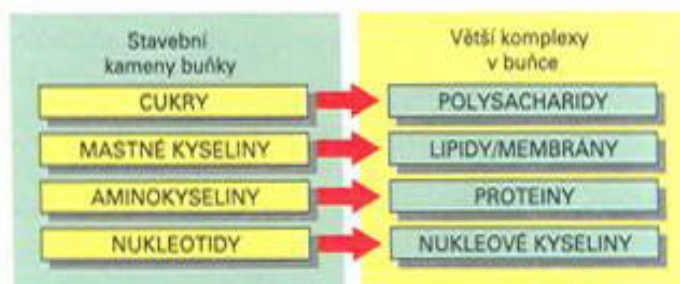
**Nukleové kyseliny** jsou prostřednictvím uložení svých bazí a specifickými vodíkovými vazbami párů bazí informačními médii pro genetický kód. Nukleové kyseliny se dále mohou skládat do chemicky aktivních komplexních struktur. Nukleoproteinové komplexy přidávají těmto strukturám další úroveň funkční rozmanitosti, což dovoluje manipulaci a expresi s geneticky zakódovanými informacemi.

Ze stejného důvodu se mohou amfifilické **fosfolipidy** samosestavovat a vytvářet životně důležité jednotlivé části buněk. Fosfolipidové dvojvrstvy jsou nejobvyklejším rozhraním, na kterém probíhají životní procesy. Role fosfolipidů není v těchto procesech doposud vyjasněna. Toto přírodní rozhraní je logickým výchozím bodem pro konstrukci syntetických rozhraní v biologii.

**Proteiny** odpovídají za většinu funkcí v biologických systémech. Enzymy jsou schopné katalyzovat obrovské množství reakcí. Příkladem velké funkční rozmanitosti jsou kanály kontrolující pohyb iontů a jiných molekul z jedné části buňky do druhé, proteiny zajišťující transport elektronů a receptory, které překládají vazby signálních molekul jako jsou steroidy, do biochemické odezvy.

**Polysacharidy**, obrovské makromolekuly sestavené ze sacharidů (cukrů), vykonávají mnoho funkcí. Buňky využívají jednoduché polysacharidy složené jen z glukózových jednotek jako dlouhodobé zásobárny energie. Polysacharidy slouží jako mechanické podpěry – celulóza je

polysacharid glukózy a je to nejrozšířenější organická sloučenina na Zemi, vytvářejí vnější kostry hmyzu (chitin), představují hlavní složky slizu, hleny a chrupavek atd. Uvedené čtyři základní stavební materiály jsou složeny z malých organických molekul (nukleotidů, mastných kyselin, aminokyselin a cukrů) – **obr. č. 4**.



**Obr. č. 4** Čtyři hlavní skupiny malých organických molekul v buňce

Struktura biologických materiálů je výsledkem jejich chemického složení a jejich prostředí. Chemické složení, jako sekvence polypeptidů proteinů nebo sekvence bazí v řetězci nukleové kyseliny, jsou určující determinanty struktury. Pro prostředí ovlivňuje strukturu těchto materiálů mnohem jemněji, ale velmi významně. Každý ze zmíněných biologických materiálů je z různých hledisek nanostrukturní.

Nanočástice a nanostruktury se obvykle definují jako subjekty o velikosti v rozmezí od 1 do 100 nm a mnoho biologických entit je klasifikováno jako nanočástice. Bakterie, které se pohybují velikostně v rozsahu od 1 do 10  $\mu\text{m}$ , patří do mezoskopické škály velikostí, zatímco viry s rozměry od 10 do 200 nm jsou v horní části velikostí u nanočástic. Bílkoviny (proteiny), které se obvykle vyskytují v rozměrech mezi 4 a 50 nm, patří ke spodní části nanometrické škály. Stavebními bloky proteinů je 20 aminokyselin, každá o velikosti kolem 0,6 nm, což je těsně pod spodním limitem velikosti nanočástice. V přírodě se vyskytuje velké množství aminokyselin, ale pouze 20 se angažuje v syntéze proteinů. Pro vytvoření proteinu jsou kombinace uvedených aminokyselin svázány jedna po druhé dohromady pomocí silných chemických peptidových vazeb a tvoří dlouhé řetězce zvané polypeptidy, obsahující stovky a v některých případech tisíce aminokyselin; svým vzhledem odpovídají nanovláknům. Polypeptidová nanovlákná procházejí kroucením a stáčením, aby se stlačily do relativně malého objemu, který odpovídá polypeptidové nanočástici o průměru s typickým rozměrem mezi 4 - 50 nm. Proto je protein nanočástice, která sestává ze stlačeného polypeptidového nanovlákná. Deoxyribonukleová kyselina tvořící genetický materiál má rovněž strukturu stlačeného nanovlákná. Typické rozměry různých biologických materiálů a struktur jsou uvedeny v **Tab. č. I**. Z tabulky mj. vyplývá, že viry můžeme ještě řadit mezi nanočástice a orgány, buňky a bakterie patří svými rozměry již do oblasti meso – či mikrostruktur. Řada z uvedených nanočástic se zkoumá s cílem jejich uplatnění v nanotechnologiích.

Podrobněji se zmíníme o základních biopolymerech – viz **obr. č. 5** - nukleových kyselinách (DNA, RNA), proteinech a polysacharidech a rovněž o malých, ale významných molekulách - o lipidech.

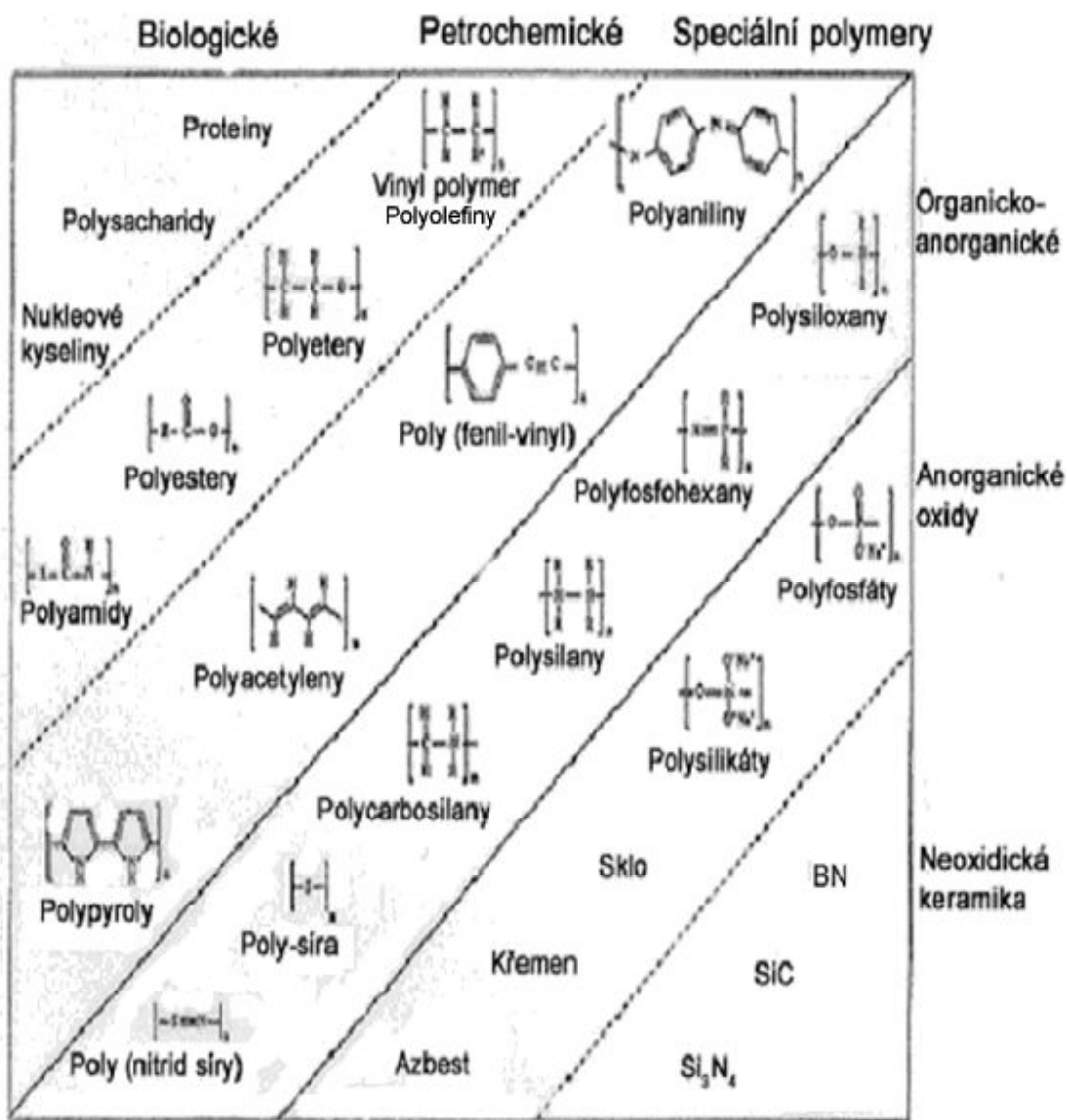
**Tab. č. I** Typické rozměry různých biologických materiálů a jejich molekulové hmotnosti

Třída	Látka	Molekulová hmotnost. Da <sup>14</sup>	Rozměr <i>d</i> (nm)
Aminokyseliny	Glycin (nejmenší aminokyselina)	75	0,42
	Tryptofan (největší aminokyselina)	246	0,90
Nukleotidy	Monofosfát cytosinu (nejmenší nukleotid DNA)	309	0,81
	Monofosfát guaninu (největší nukleotid DNA)	361	0,86
	Adenosin trifosfát (ATP, zdroj energie)	500	0,95
Jiné molekuly	Sterická kyselina C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> CO <sub>2</sub> H	284	0,87
	Chlorofyl, v rostlinách	720	1,1
Proteiny	Insulin, polypeptidový hormon	6000	2,2
	Elastin, nosný materiál buňky	72000	5,0
	Hemoglobin, nositel kyslíku	68000	7,0
	Gamaglobulin		4,5 x 7,0
	Albumin, bílek ve vejcích	69000	9,0
	Lipoprotein, nositel cholesterolu	1300000	20,0
	Fibrinogen, bílkovina krevní plazmy, srážení krve	400000	4,0 x 76,0
	Granule glykogenu v játrech		150
Viry	Picornaviridae (kubický)		20,0
	Chřipka		60,0
	Tabákový mozaikový virus, délka		120,0
	Bakteriofág T2		140,0
	Variola major (pravé neštovice)		180 x 250 x 350
Organely <sup>2</sup>	Mitochondrie <sup>3</sup>		500 x 900 x 3000
	Chloroplast, místo v buňce, kde probíhá fotosyntéza, délka		4000
	Ribozom <sup>1</sup>		20 x 30
	Lyzozom <sup>4</sup>		700
	Vakuola améby		10000
Buňky	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ), bakterie, délka		8000
	Lidská krevní destička		3000
	Leukocyt (bílá krvinka), kulovitý tvar		8000 – 15000
	Erytrocyt (červená krvinka), diskovitý tvar		1500 – 8000
Různé	Lidský chromozom		1400 x 6000

- Poznámky: 1) Ribozom je základní částice v cytoplazmě buňky, složená z bílkovin a nukleových kyselin, na níž probíhá syntéza proteinů  
 2) Organela je ohraničený útvar v eukaryontní buňce  
 3) Mitochondrie je hrudkovitý, tyčinkovitý nebo vláknitý útvar v plazmatu buněk  
 4) Lyzozom je intracelulární membránová organela obsahující trávicí enzymy

<sup>14</sup> Dalton (Da) – jednotka molekulové hmotnosti definovaná jako jedna dvanáctina hmotnosti atomu uhlíku <sup>12</sup>C (1,66x10<sup>-24</sup> g), tedy přibližně jako hmotnost jednoho atomu vodíku.





Obr. č. 5. Klasifikace různých typů polymerních systémů

#### 4.2.1. NUKLEOVÉ KYSELINY (DNA, RNA)

Život závisí na schopnosti buněk uchovávat, třídit a překládat genetickou informaci, která je potřebná k vytvoření a udržení živého organismu. Při buněčném dělení přechází tato dědičná informace z mateřské buňky do dceřině a u organismů je přenášena z generace na generaci pohlavními buňkami. Tato informace je uložena v každé živé buňce v podobě genů, což jsou základní jednotky, které určují vlastnosti jak jednotlivce, tak celého druhu.

Existují dva hlavní druhy nukleových kyselin, které se liší typem cukru ve své sacharidofosfátové páteři. Ty, které obsahují cukr ribozu, jsou známy jako ribonukleové kyseliny (RNA) a ty, které obsahují deoxyribozu jsou známy jako deoxyribonukleové kyseliny (DNA). RNA se v buňkách vyskytuje obvykle jako malý polynukleotidový řetězec, zatímco DNA existuje téměř vždy jako dvouvláknová molekula složená ze dvou polynukleotidových řetězců, přičemž tyto řetězce mají vůči sobě opačný směr (jsou antiparalelní) a drží pohromadě vodíkovými můstky mezi bazemi obou řetězců.

DNA byla poprvé identifikována O.Averyem v roce 1940 jako pravděpodobný nosič genetické informace. Postupně se ukázalo, že DNA je opravdu nositelkou genetické informace všech organismů s výjimkou těch nebuněčných organizmů, u nichž sehrává tuto úlohu ribonukleová kyselina RNA (RNA-viry, virusoidy a viroidy). Mechanismus, jímž je dědičná informace kopírována pro přenos z buňky do buňky, a jak mohou být proteiny určeny instrukcemi v DNA, zůstal neobjeven až do roku 1952, kdy J.Watson a F.Crick určili dvojšroubovicovou strukturu DNA. Tato struktura umožňuje zachování dědičnosti.

Úloha RNA v syntéze proteinů byla předpokládána již v roce 1939, ale teprve v roce 1964 byla R.W. Holleyem nalezena sekvence 77 nukleotidů tRNA v kvasnicích.

V poslední době byly vytvořeny syntetické nukleové kyseliny (PNA, LNA a další). Sekvence různých nukleových kyselin jsou běžně dostupné na trhu<sup>15</sup>.

#### 4.2.1.1. DNA

DNA (deoxyribonukleová kyselina) je nukleová kyselina obsahující genetické instrukce určující biologický vývoj všech buněčných forem života a většiny virů. Je to dlouhý polymer nukleotidů, který kóduje sekvenci zbytků aminokyselin v proteinech užitím genetického kódu, trojčlenného kódu nukleotidů.

V komplexních eukaryontních buňkách rostlin, živočichů, hub a prvoků se většina DNA nachází v jádrech buněk – viz **obr. č. 28**. V jednodušších prokaryontních buňkách bakterií a archea není DNA oddělena od cytoplazmy jadernou obálkou. Buněčné organely jako chloroplasty a mitochondrie rovněž obsahují DNA.

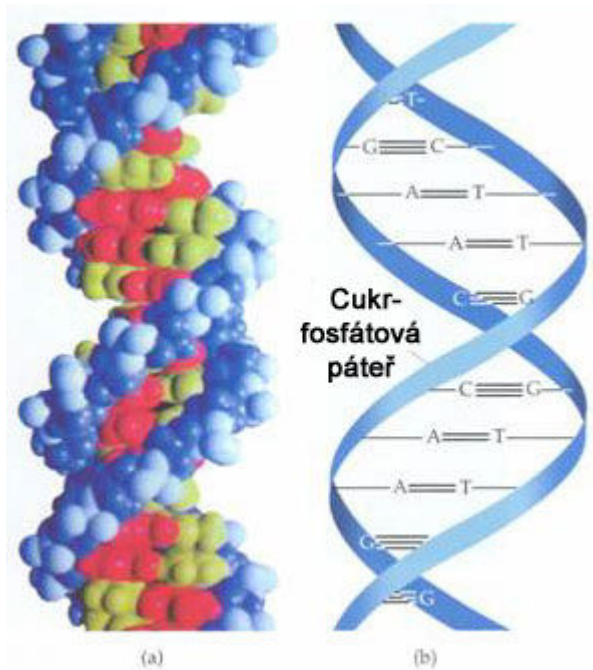
Počítačový model nejobvyklejší konformace DNA, B-DNA, je na **obr. č. 6**. a její schematické znázornění a chemická struktura je na **obr. č. 7**. Základními strukturami B-DNA jsou čtyři molekuly nukleotidů, které jsou k sobě spojeny v dlouhém pravotočivém dvojšroubovicovém nanovlákně (u lidí je asi 6 mm dlouhé), aby vytvořily chromozomy<sup>16</sup>, které jsou v člověku obsaženy v počtu okolo  $2 \cdot 10^8$  nukleotidů ve sledech za sebou. Molekulu DNA tedy tvoří dvě nukleotidová nanovlákně, která jsou obtočena jedno kolem druhého v útvaru o průměru 2 nm. Jedna otočka dvojšroubovice je asi 3,5 nm nebo 10–10,5 bází dlouhá. Toto dlouhé dvojité spletené nanovlákně prochází systematickým kroucením a točením, aby se umístilo do chromozomu asi 6  $\mu\text{m}$  dlouhého a 1,4  $\mu\text{m}$  širokého. Samotný chromozom není natolik malý, aby byl nanočásticí; spíše se pohybuje v mezoskopické rozměrové škále.

DNA je tvořena čtyřmi typy nukleotidů, které jsou kovalentně spojeny v polynukleotidovém řetězci s cukr – fosfátovou páteří, ze které vyčnívají jednotlivé báze (adenin, thymin, cytosin a guanin). U RNA je thymin nahrazen uracylem. Jednotlivý nukleotid je tvořen fosfátovým iontem, molekulou cukru a bází a má délku 0,34 nm. Molekulu DNA tvoří dva polynukleotidové řetězce, které jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi páry bází – **obr. č. 7**. Obě vlákna DNA jsou k sobě antiparalelní. Fosfátové ionty nesou v molekule DNA negativní náboj. Je-li molekula v elektrickém poli, vzniká drift, který se využívá při aplikacích elektroforézy. Negativní náboj vytváří elektrostatickou odpudivou sílu v obou vláknech a pro její neutralizaci je zapotřebí přítomnost pozitivních iontů v okolí dvojšroubovice. Spojení jednotlivých vláken vodíkovými vazbami se nazývá hybridizace. Je-li dvojšroubovice zahřívána nad určitou teplotu  $T_m$ , která se nazývá teplota tání, rozdělí se na jednotlivé vlákna (denaturace).  $T_m$  je funkcí teploty, koncentrace iontů v prostředí a obsahu G-C v sekvenci. Je-li teplota opět snížena, vlákna se mohou opět spojit do dvojšroubovice. Mimo uvedené B-

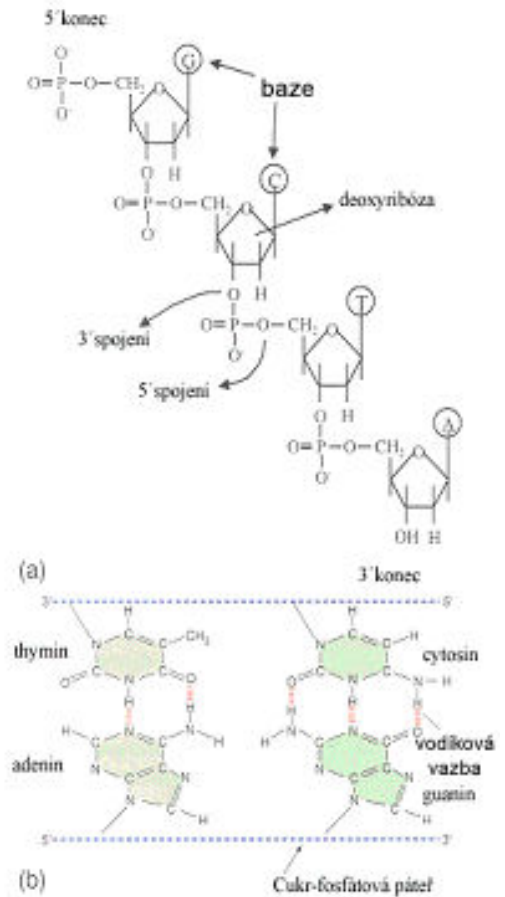
<sup>15</sup> [www.biosyn.com](http://www.biosyn.com), [www.alphadna.com](http://www.alphadna.com), [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), [www.bioconsult.cz](http://www.bioconsult.cz) atd.

<sup>16</sup> **Chromozom** – dlouhý vláknitý útvar složený z DNA a asociovaných proteinů, který nese částečnou nebo úplnou genetickou informaci o organismu. U eukaryontní buňky se chromozomy nacházejí v jejím jádru.

DNA jsou známy další dvě dvojšroubovicové formy, a to A-DNA, která je 11-12 bazí dlouhá a vyskytuje se pravděpodobně v dehydratovaných vzorcích DNA a Z-DNA, která je levotočivá a je zrcadlovým obrazem B-DNA. Tuto konformaci mohou mít DNA v buňkách, které prošly metylací.



**Obr. č. 6.** Model a schéma struktury B-DNA  
A-adenin, G-guanin, T-thymin, C-cytosin jsou nukleotidy



**Obr. č. 7** Chemická struktura B-DNA  
a. Cukr - fosfátová páteř DNA. Jednotka sestávající z fosfátu, molekuly cukru a bazí se nazývá nukleotid a je cca 0,34 nm dlouhá.  
b. Čtyři baze DNA naznačující jejich komplementární vazební vlastnosti

Některé další konformace DNA:

- **ssDNA (single-stranded DNA)** – je jednovláknová. Vlákno této DNA je rovné. ssDNA se vyskytuje v některých virech.
- **Plasmid DNA** – má kruhovou dvojšroubovicovou konformaci. Konce B-DNA jsou svázány do kruhu s převisy 2' a 3' koncích.
- **mtDNA (mitochondriální DNA)** – je DNA umístěná v mitochondriích. Sestává z 5-10 dvojšroubovicových kruhů (plasmidů). Zprostředkovává dědičné znaky po matce.

- **Lambda DNA ( $\lambda$  – DNA, lambda phage)**. Je to dsDNA vyskytující se v bakteriofágu *Enterobacteria*  $\lambda$ , který infikuje *E.coli*<sup>17</sup>. Používá se často při výzkumu využití DNA, např. v nanoelektronice.
- Existují modely DNA z nespletených vláken, tzv. **SBS DNA (side-by-side)**, skýtající jiný pohled na dvojšroubovicovou B-DNA<sup>18</sup>.

Dvojšroubovicové modely DNA mají nedořešené problémy, např. předpokládaný průřez dvojšroubovice nemusí být kruhový ale eliptický, její průměr 2 nm není spolehlivě potvrzen atd.<sup>19</sup>

V každodenním životě se zřídka setkáváme s čistými nukleovými kyselinami. Jsou-li nukleové kyseliny izolovány z buněk a vysušeny, bývají vláknitého typu a dost se podobají vláknům bavlny.

Pro podrobnější informace odkazujeme na publikaci<sup>19</sup>.

#### 4.2.1.2. RNA

Jak již bylo uvedeno, RNA se v buňkách vyskytuje převážně jako jeden malý polynukleotidový řetězec. Syntéza RNA je obvykle katalyzována enzymem RNA polymerázou, ze použití DNA jako templátu. Jednořetězcové RNA molekuly mají tendenci vázat se navzájem vodíkovými vazbami, aby dosáhly minimálního energetického stavu. To vede k rozpoznatelným doménám terciární struktury jako jsou různé smyčky, vydutí apod.<sup>20</sup> Většina molekul RNA má funkci zprostředkovatelů přenášejících informace z genů do translačního mechanismu (viz 4.2.2). Mezi nejznámější výjimky patří mRNA, rRNA a tRNA, které jsou přímo zapojeny do procesu translace.

- mRNA (mediátorová RNA, messenger RNA) – její základní funkcí je řídit vznik proteinů. Kóduje proteiny.
- rRNA (ribosomální RNA) – tvoří jádro ribozomů, na kterých je mRNA překládána do proteinu. rRNA molekuly se vyskytují velmi hojně. Tvoří nejméně 80 % všech RNA molekul v typické eukaryontní buňce.
- tRNA (transferová RNA) – je malý řetězec 74-93 nukleotidů, který vybírá správné aminokyseliny, a umísťuje je do správného místa na ribozomu, aby při proteosyntéze mohly být začleněny do rostoucího aminokyselinového řetězce.

Koncem devadesátých let minulého století již bylo známo, že v mnoha různých organizmech, od bakterií po živočichy, se vyskytují různé typy nepřeměněných (non-translated) molekul RNA. Tyto molekuly významně ovlivňují mnoho procesů jako replikaci plasmidů, vývoj fágů, strukturu chromozómů, transkripci DNA, vytváření a modifikaci RNA atd. Tyto nepřeměněné RNA dostávaly různá jména, přičemž název sRNA (small RNA) byl rezervován především pro bakteriální RNA a název ncRNA (non-coded RNA) je obvyklejší u eukaryot. Existují databáze ncRNA. Např. databáze NONCODE registruje v současné době 109 tříd ncRNA<sup>21</sup>.

Z ncRNA je vhodné se zmínit o:

- miRNA (malé RNA, micro RNA) – je forma jednořetězcové RNA o délce typicky 20-25 nukleotidů, o které se předpokládá, že reguluje genovou expresi. miRNA jsou RNA geny, které byly přepsány z DNA, ale nebyly přeměněny na proteiny. Termín byl

<sup>17</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Lambda\\_phage](http://en.wikipedia.org/wiki/Lambda_phage)

<sup>18</sup> Delmonte C.S., Mann L.R. „Variety in DNA Secondary Structure“, Current Science, 85, 2003, str. 1564

<sup>19</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, ISBN 80-902905-0-4, str. 183

<sup>20</sup> [www.imb-jena.de/image-RNA.html](http://www.imb-jena.de/image-RNA.html).

<sup>21</sup> [www.bioinfo.org.cn/NONCODE/Index2.htm](http://www.bioinfo.org.cn/NONCODE/Index2.htm).

zaveden v roce 2001. miRNA se vyskytuje v rostlinách, zvířatech i lidech. Velký zájem vzbudilo zjištění, že miRNA má souvislost s některými druhy rakoviny.

- siRNA (small interfering RNA) – je to dvouvláknová molekula RNA o délce 20-25 nukleotidů s převisy 2' a 3' koncích. Má různé biologické role, zejména má vliv na expresi genů při RNA interferenci (RNAi). RNAi je proces užívaný eukaryoty ke ztlumení genové exprese před a po transkripci – viz **obr. č. 8**. Použití RNAi jako laboratorního nástroje významně napomohlo studiu funkcí eukaryotních genů.<sup>22</sup>
- dsRNS (double-stranded RNA) – je RNA s dvěma komplementárními řetězci. Je podobná DNA. Tvoří genetický materiál některých virů.
- pRNA (packaging RNA) – je komplex šesti identických krátkých sekvencí RNA, které slouží při sbalování DNA v motoru bakteriálního viru phi29.

#### 4.2.1.3. Syntetické DNA

Řada DNA byla připravena synteticky:

##### 4.2.1.3.1. cDNA

cDNA (complementary DNA), je DNA syntetizovaná z vyztalého (vyschlého) templátu mRNA. Ústřední dogma molekulární biologie určuje, že při syntéze proteinů je DNA přepsána do mRNA, která je přeložena do proteinu. Jeden z rozdílů mezi eukaryotní a prokaryotní mRNA je, že eukaryotní mRNA může obsahovat introny<sup>23</sup>, které nekódují sekvenci a musí být odstraněny (sestříženy) z mRNA dříve, než je přeměněna na protein. Prokaryotní mRNA nemá introny, a proto není sestřížení potřeba. cDNA je většinou syntetizována ze sestřížené mRNA za užití enzymové reverzní transkripce. cDNA je často používána ke klonování eukaryotních genů v prokaryotech (bakteriích) nebo při vytváření cDNA knihoven.

##### 4.2.1.3.2. PNA

PNA (peptidová nukleová kyselina) je napodobenina DNA s pseudopeptidovou páteří. PNA se nevyskytuje v přírodě. Byla původně syntetizována jako ligand pro rozpoznávání dvojvláknové DNA. Má některé specifické vlastnosti<sup>24</sup>:

- Páteř PNA neobsahuje nabitě fosfátové skupiny, a proto je vazba mezi vlákny PNA/DNA silnější než mezi DNA/DNA (není přítomné elektrostatické odpuzení).
- Pro enzymy jako nukleáza a proteáza je PNA obtížně rozpoznatelná, takže je odolná proti degradaci enzymy.
- PNA je stálá v širokém rozsahu pH.
- Jelikož PNA postrádá náboj, snadněji proniká buněčnými membránami, což zlepšuje její terapeutickou hodnotu.

Používá se v biologickém výzkumu a v medicíně.

<sup>22</sup> Jaronczyk K., Carmichael J.B., Hobman T.C. „Exploring the Functions of RNA Interference Pathway Proteins: Some Function Are More RISCy Than Others?“, *Biochem. J.*, 387, 2005, str. 561

<sup>23</sup> **Intron** – je úsek eukaryotního genu (část řetězce DNA), který nekóduje protein, ale je přepisován do molekuly RNA a později odstraněn sestříhem RNA při produkci mRNA.

<sup>24</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/PNA>

#### 4.2.1.3.3. LNA

LNA (locked nucleic acid) je napodobenina RNA, která projevuje vynikající afinitu hybridizace ke komplementární DNA a RNA. Má duplexní geometrii A-typu. Ukazuje se, že je to velmi slibná molekula pro vývoji terapeutik založených na oligonukleotidech<sup>25</sup>.

#### 4.2.1.3.4. TNA

TNA (threose nucleic acid) je synteticky vytvořená nukleová kyselina chemicky podobná DNA a RNA<sup>26</sup>, liší se složením „páteře“. Páteř obsahuje periodicky umístěné jednotky threózy (monosacharid) spojené peptidovými vazbami.

#### 4.2.1.3.5. DL-DNA a Y-DNA

DL-DNA (dendrimer-like DNA a Y-DNA (Y-shaped DNA) byly syntetizovány jako molekuly kulovitého tvaru, alternativy k lineárním či kruhovým molekulám DNA<sup>27</sup>. Vytvořené molekuly jsou nanostrukturní, ve vodě rozpustné, mimo ni stabilní a téměř monodisperzní. Mají velký potenciál pro spojování s dalšími molekulami. Mohou sloužit v nanotechnologiích jako templát pro syntézu a nanomedicíně.

#### 4.2.1.3.6. M-DNA

M-DNA (Metal - DNA) je komplex DNA – kov, objevený náhodně v roce 1992, který se vytváří při specifické hodnotě pH (cca 9), pokud jsou v roztoku s DNA dvojjvalentní kovové ionty (např. Zn). Předpokládá se, že kovové ionty nahrazují imino protony thyminu a guaninu v bazích T-A a C-G.. Má dobrou vodivost a chová se jako specifický molekulární vodič<sup>28</sup>.

### 4.2.2. PROTEINY A PEPTIDY

Proteiny a peptidy jsou nejvšestrannější biologické stavební částice. Přírodou jsou z nich vytvářeny nanostroje, nanostruktury a nanosenzory různých vlastností. Jsou modulární a konstruovány z lineárních řetězců aminokyselin spojených peptidovou vazbou a poskládaných do definované struktury. Podle počtu aminokyselin v molekule rozlišujeme **oligopeptidy** (2-10 aminokyselin), **polypeptidy** (11-100 aminokyselin) a **proteiny** (s více než 100 aminokyselin). Základním strukturním prvkem těchto molekul je **peptidová (amidová) vazba**. Jejím prostřednictvím jsou spojeny jednotlivé aminokyselinové zbytky v polymerní řetězce. Uvedené dělení podle délky řetězce je pouze orientační. Důležitější je rozlišení podle způsobu vzniku. Proteiny jsou produktem proteosyntézy (viz dále), která je řízena genetickou informací. Peptidy vznikají buď sekundárně (štěpením z prekurzorů vyráběných v průběhu **proteosyntézy** a případnou chemickou modifikací vzniklých štěpů), nebo jednoduchou biosyntézou bez použití proteosyntetického aparátu<sup>29</sup>.

**Proteosyntéza** (biosyntéza bílkovin – proteinů) je v pojetí molekulární genetiky translací (překladem) strukturních genů z „čtyřpísmenné“ řeči nukleotidů do „jazyka“ sestávajícího z 20 aminokyselinových písmen. Z 20 aminokyselin, které se vyskytují v lidském organismu, může v případě jednoduchého proteinu složeného ze 100 aminokyselin vzniknout 20<sup>100</sup>

<sup>25</sup> Petersen M., Wengel J. „LNA: a Versatile Tool for Therapeutics and Genomics“, Trends Biotechnik., Feb. 2003, str. 74.

<sup>26</sup> Orgel L. „A Simpler Nucleic Acid“, Science, 290, 2000, str. 1306, [http://en.wikipedia.org/wiki/TNA\\_\(nucleic\\_acid\)](http://en.wikipedia.org/wiki/TNA_(nucleic_acid))

<sup>27</sup> Li Y. et al „Controlled Assembly of Dendrimer-like DNA“, Nature Materials, 3, 2004, str. 38.

<sup>28</sup> Wettig S.D. et al „M-DNA: a Self-assembling Molecular Wire for Nanoelectronics and Biosensing“, Analytical Science, 19, 2003, str. 23.

<sup>29</sup> Vodrážka Z.: „Biochemie“, Academia, Praha, 2002, ISBN 80-200-0600-1, 3.kniha, str. 25.

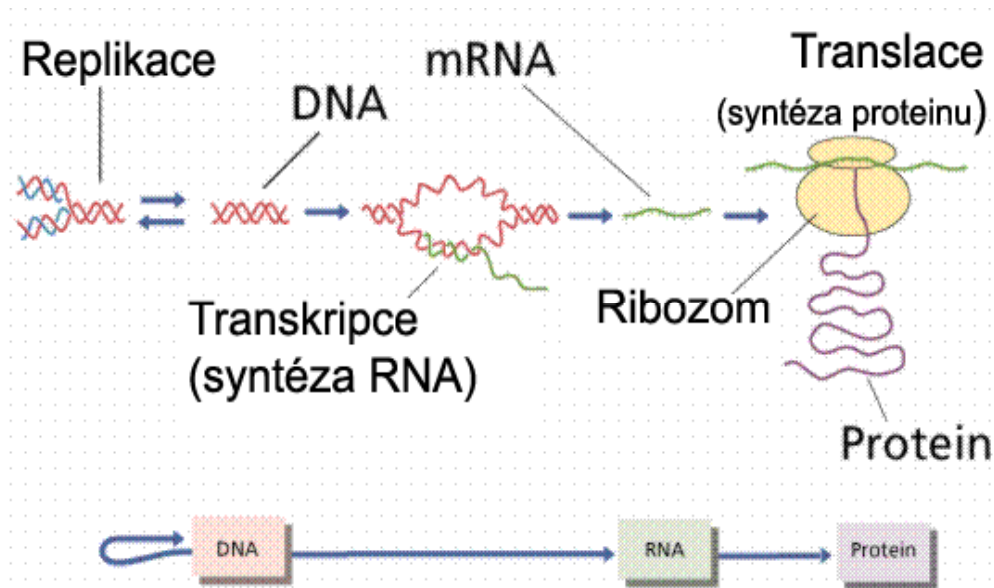
rozdílných proteinových struktur. Proteosyntéza je pokládána za jeden z nejzákladnějších a nejvíce fascinujících životních dějů. Zjednodušené schéma mechanismu proteosyntézy je znázorněno na **obr. č. 8**. Všechny typy buněk, od bakterií až po člověka, přeměňují genetickou informaci zakódovanou v DNA chromozomů způsobem uvedeným na obrázku. Tento princip je tak obecný, že byl nazván ústředním dogmatem molekulární biologie.

Proces probíhá dále zjednodušeně popsáním způsobem:

Pro zachování genetické informace musí být molekuly DNA neustále replikovány syntézou nového komplementárního řetězce ke každému původnímu řetězci dvojšroubovice. Při tvorbě proteinu je genetická informace přenášena z DNA do RNA a odtud do proteinů. Tato konverze se nazývá **genová exprese**. Pro vyjádření genetické informace uložené v DNA je nukleotidová sekvence nejprve přepsána do RNA. Tento proces, nazývaný transkripce, je katalyzován enzymem RNA-polymerázou. V nukleotidové sekvenci je zapsáno, kdy má proces začít a kdy skončit. Jeden řetězec DNA dvojšroubovice je použit jako templát RNA polymerázou pro syntézu informační RNA (mRNA). mRNA migruje z jádra buňky do cytoplazmy a přitom prochází různými stupni zrání a dělení. Syntéza proteinu (translace) probíhá v ribozomech za vzniku polypeptidových řetězců a vytváří se protein.

Genová exprese je však regulovaná speciálními regulačními proteiny. Ty určují, kdy dojde k produkci určitého proteinu, a tím kontrolují genovou expresi. K expresi dojde zapnutím nebo aktivací určitého genu.

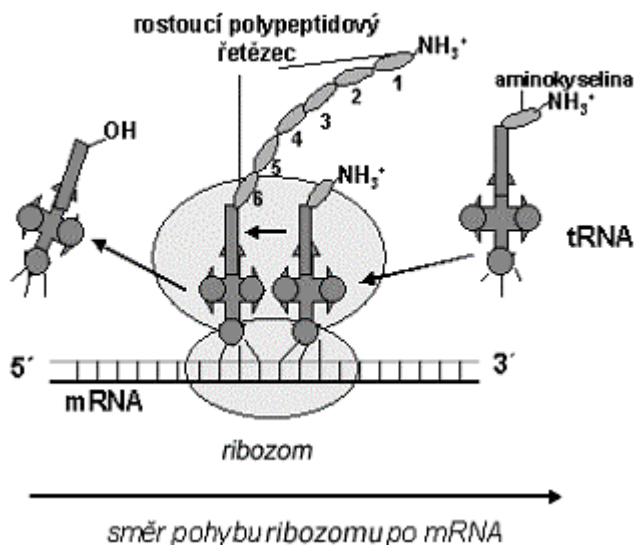
Způsob jakým probíhá translace na ribozomu je blíže znázorněn na **obr. č. 9**. Úkolem ribozomového komplexu, na kterém se děje syntéza polypeptidového řetězce, je rychlý a přesný přenos genetické informace (translace) z informační RNA (mRNA) do tvořícího se proteinu tak, že ribozom se pohybuje podél mRNA, zachytává komplementární molekuly transferové RNA (tRNA), přinášející vhodné aminokyseliny, drží je ve správné pozici a spojuje na nich navázané aminokyseliny do postupně narůstajícího polypeptidového řetězce. Syntéza většiny proteinů trvá 20 sekund až několik minut. Tato doba se ještě zkracuje tím, že na jedné mRNA může pracovat několik ribozomů (tzv. polyzomů).



**Obr. č. 8** Schéma mechanismu proteosyntézy

**Ribozomy** jsou nejsložitější nukleoproteinové komplexy buňky. Jak je zřejmé z obrázků, skládají se ze dvou různě velikých nekovalentně spojených podjednotek. U eukaryontních

buněk má velká podjednotka přibližně sférickou strukturu a měří cca 15 x 38 nm. Menší podjednotka má tvar disku, měří cca 9,5 x 28 nm a má konvexní a konkávní plochu. Obě podjednotky jsou spolu spojené a tvoří vejcovitý útvar o velikosti 25 x 10 nm.



**Obr. č. 9.** Ribozomální syntéza polypeptidu na matrici mRNA<sup>30</sup>

Struktura a chemie jednotlivých proteinů se vyvinuly a upravily v průběhu uplynulých miliard let. Bez nadsázky, z chemického hlediska jsou proteiny nejsložitější a nejdůmyslnější známé molekuly. I když názvu protein použil Berzelius již v roce 1838, struktura prvního proteinu byla podrobně popsána Kendrewem až v roce 1960.

Nejdelší známý proteinový řetězec je titin sestávající s více než 26000 aminokyselin. Na druhé straně peptidy s méně než desítkou aminokyselin tvoří hormon pro signalizaci v buňkách. Typické rozpustné proteiny mají řetězce o 200 – 500 aminokyselinách<sup>31</sup>. Rozlišujeme čtyři úrovně struktur proteinů a peptidů.

Primární struktura je lineární sekvencí aminokyselin, svázaných navzájem peptidovou vazbou..Tato struktura specifikuje další úrovně.

Dvě z možných konformací sekundární struktury proteinů jsou nejstabilnější:  $\alpha$  – šroubovice (**obr.č. 10**) a  $\beta$  – struktura (**obr.č. 11**). Obě kombinují minimální deformaci a přesahy v molekulární struktuře s maximálním počtem vodíkových vazeb mezi atomy aminů. Řetězce aminokyselin mohou být uspořádány i náhodně. Genetická informace totiž nemůže predikovat modifikace struktury proteinů.

Terciární struktura je již trojrozměrnou konformací kompletního proteinu. Vzniká spontánním skládáním proteinu.a poté protein může vykonávat svoji biologickou funkci. Proces skládání trvá vteřiny až minuty. Skládání proteinů je v současnosti velkým problémem bionanotechnologie, protože prozatím neumíme předpovědět, jak se protein složí<sup>32</sup>.

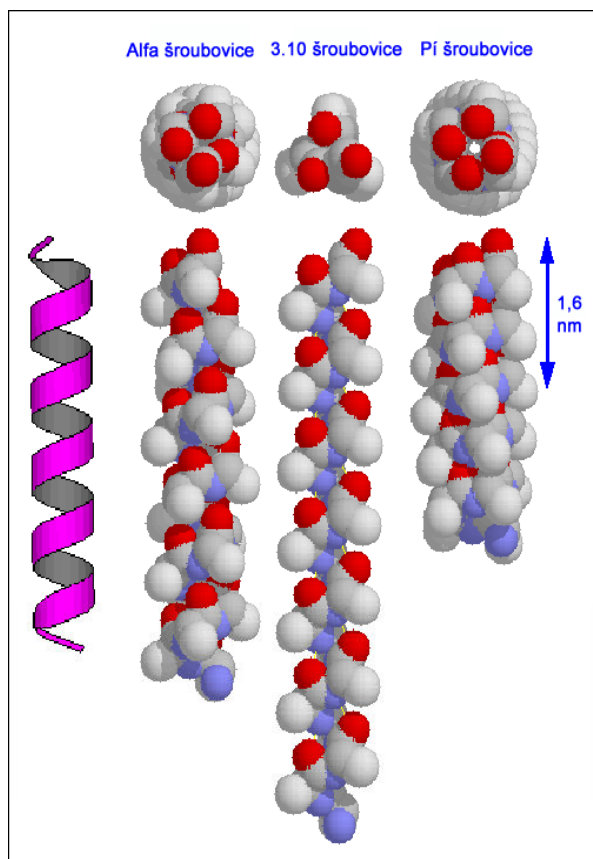
Sestává-li funkční protein z několika podjednotek, vytvoří se kvaternární struktura svázaná elektrostatickými nebo vodíkovými vazbami. Mnohojednotkové proteiny se nazývají **oligomery** a různé složky částí proteinu jsou monomery nebo podjednotky. Proteiny mohou rovněž obsahovat jiné struktury než na bázi aminokyselin, např. deriváty vitaminů, minerály, lipidy nebo uhlovodany.

<sup>30</sup> Masopust J.: „Patobiochemie buňky“, vyd. UK-2LF, Praha, skripta, 2003

<sup>31</sup> Goodsell D.S.: „Bionanotechnology“, vyd. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2004, str. 16, ISBN 0-471-41719-X

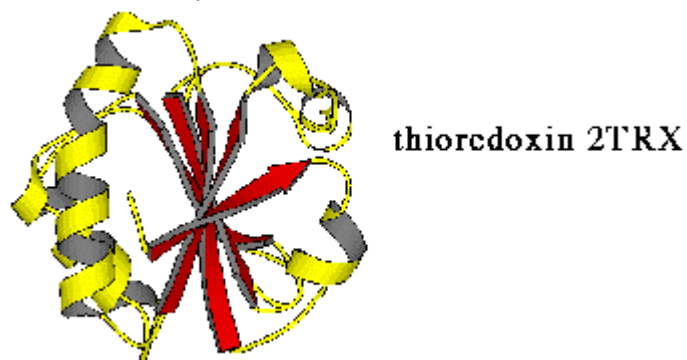
<sup>32</sup> Goodsell D.S.: „Bionanotechnology“, vyd. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2004, str. 69, ISBN 0-471-41719-X





**Obr. č. 10.** Motivy  $\alpha$  – šroubovice proteinu

**Obr. č. 11.**  $\beta$  – struktura proteinu thioredoxin 2TRX1



Základní charakteristiky proteinů shrnul B. Alberts et al<sup>33</sup>:

- Každý typ proteinu má jedinečné pořadí aminokyselin, které určuje jeho trojrozměrnou strukturu a biologickou aktivitu
- Četnost funkcí, které proteiny zajišťují, pramení z obrovského množství různých tvarů, kterých mohou v prostoru nabývat
- Svinutá struktura proteinu je stabilizována nekovalentními interakcemi mezi různými částmi polypeptidového řetězce
- Pravidelné strukturní typy, jako jsou  $\alpha$ -šroubovice a  $\beta$ -struktura jsou běžné strukturní motivy proteinů. Vznikají vodíkovými vazbami mezi sousedními oblastmi polypeptidové kostry
- Biologická funkce proteinu závisí na detailních chemických vlastnostech jeho povrchu a na způsobu jeho vazby k jiným molekulám (ligandům)
- Trojrozměrná struktura proteinu se vyvinula tak, že navázání malé molekuly může vyvolat významnou změnu ve tvaru proteinu
- Motorové proteiny generují rozsáhlé pohyby v buňce
- Proteiny často vytvářejí velké komplexy, které fungují jako proteinové stroje

<sup>33</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, ISBN 80-902905-0-4, str. 133

V části 2.6. se nachází stručná informace o **proteinovém inženýrství** jako o důležité součásti moderní biotechnologie. Jde o vytváření proteinových sekvencí, jejichž specifické funkce jsou určeny jejich trojrozměrným tvarem. Cílem je mj. příprava umělých enzymů a racionální vývoj léků. Rozvoj proteinového inženýrství byl umožněn rostoucími znalostmi ve vědních oblastech biologie jako je biochemie, biofyzika, molekulární a strukturní biologie, genomika a proteomika<sup>34</sup>. V současné době do značné míry rozumíme tomu, co proteiny dělají a jak mohou být jejich funkce modifikovány pro zlepšení syntetických struktur, včetně úplně umělých proteinů.

Příklady některých obecných funkcí proteinů se nacházejí v **Tab. č. II.**

#### **Tab. č. II: Příklady některých obecných funkcí proteinů**

**Enzymy** – existuje tisíce různých enzymů. Jsou to molekuly, které řídí všechny chemické přeměny probíhající v buňkách. Fungují zejména jako katalyzátory reakcí. Hlavní typy enzymů: hydrolázy, nukleázy, proteázy, syntázy, izomerázy, polymerázy, kinázy, fosfatázy, oxidoreduktázy, adenosintrifosfatázy, lysozym

**Strukturní proteiny** – poskytují mechanickou oporu buňkám a tkáním. Hlavní typy: kolagen, elastin, tubulin, aktin,  $\alpha$ -keratin

**Transportní proteiny** – přenášejí malé molekuly a ionty. Hlavní typy: serumalbumin, hemoglobin, transferrin, bakteriorhodopsin

**Pohybové (motorové) proteiny** – jsou původcem pohybu buněk a tkání. Hlavní typy: myosin, kinesin, dynein,  $F_0F_1$ ATPáza

**Zásobní proteiny** – skladují malé molekuly nebo ionty. Hlavní typy: ferritin, ovalbumin, kasein

**Signální proteiny** – přenášejí informační signály z buňky do buňky. Hlavní typy: insulin, mnoho hormonů, netrin, růstové faktory (NGF, EGF)

**Receptorové proteiny** – detekují chemické a fyzikální signály v buňkách a předávají je buňkám ke zpracování. Hlavní typy: rhodopsin, acetylcholinový receptor, insulinový receptor, adrenergní receptor

**Regulační proteiny v genové expresi** – váží se na DNA a spouštějí nebo vypínají transkripci. Hlavní typy: laktosový represor, mnoho homeodoménových proteinů

**Proteiny se zvláštním posláním** – mají velmi rozmanité funkce.

### **4.2.3. LIPIDY**

Lipidy jsou chemicky nejednotná skupina hydrofobních a amfifilních látek, jež tvoří látkovou podstatu nevodných fází živých soustav, zejména jejich membrán. V dispergované formě jsou obsaženy i ve vodních fázích organismů. Rozeznáváme lipidy odvozené od mastných kyselin (jednoduché lipidy, složené lipidy, glyceridy, vosky, fosfolipidy, glykoplipidy, spingolipidy a prostaglandiny) a odvozené od isoprenu (terpenoidy, karotenoidy a steroidy)<sup>35</sup>. Lipidy mají v organizmech funkci strukturní (jako součásti biologických membrán), ochrannou

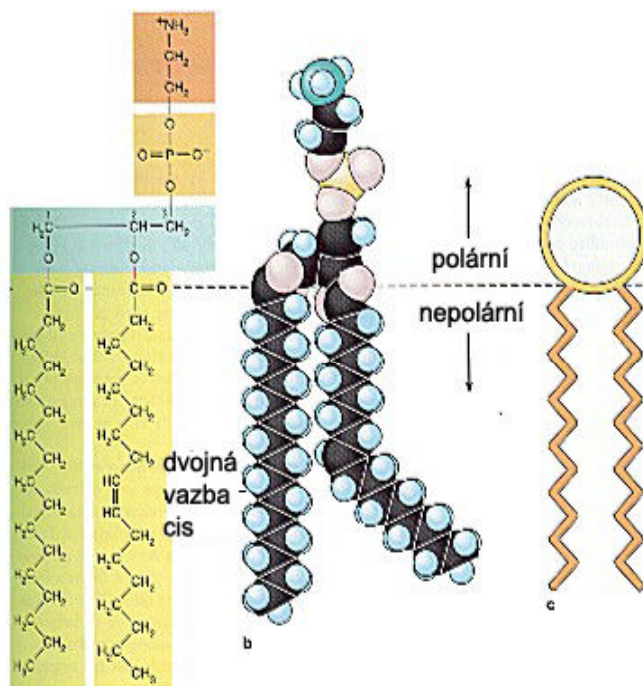
<sup>34</sup> **Genomika** - věda, která studuje geny a jejich funkce. Je to i technologie, která vytváří mapu všech genetických informací lidí, zvířat rostlin a mikroorganismů,

**Proteomika** – je součástí genomiky a zabývá se identifikací proteinů v těle a stanovení jejich úlohy v životních pochodech uvnitř těl organismů. Je to studium proteomů (soubor všech proteinů v daném organismu).

<sup>35</sup> Technický slovník naučný, část K-L, vyd. Encyklopedický dům, Praha, 2003, str. 383, ISBN80-86044-21-1.

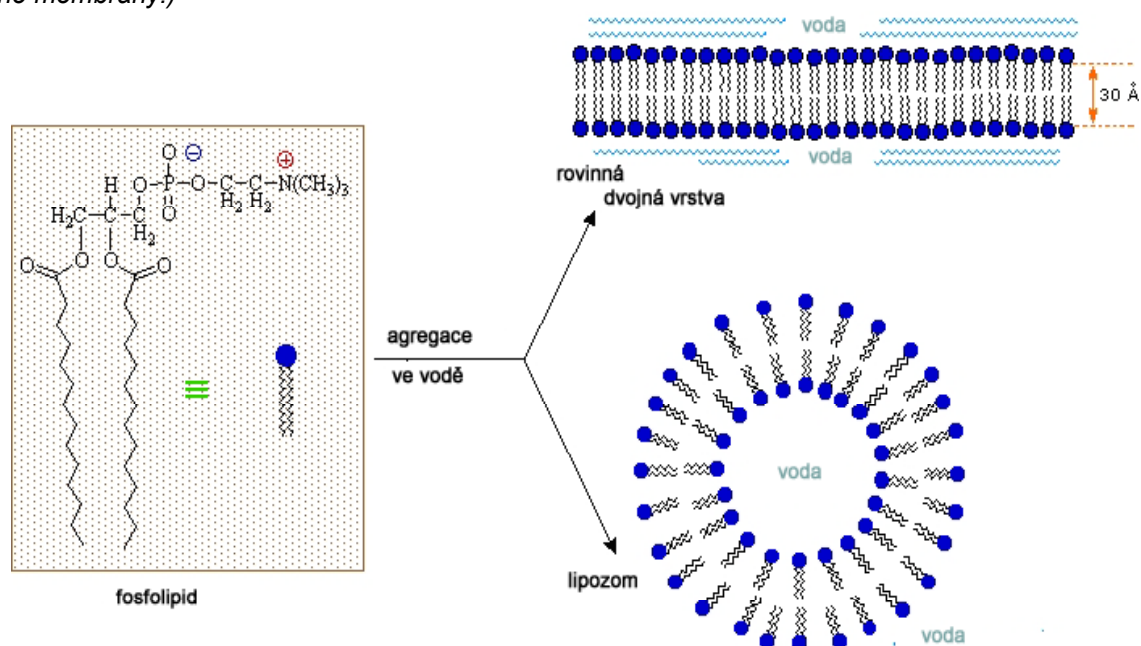
(tepelně a mechanicky izolující tuková tkáň, vosky na povrchu listů rostlin bránící nežádoucímu odpaření vody) a regulační (steroidní hormony, vitaminy A, D, E, a K aj.).

Zajímavá heterogenní skupina lipidů jsou **polární lipidy**. Jejich molekula obsahuje polární (hydrofilní) skupinu (polární hlavici) a nepolární (hydrofobní) část. Struktura polárního lipidu, v daném případě fosfolipidu, které jsou hlavní součástí buněčných membrán, je na **obr. č. 12**. Celková délka lipidové molekuly dosahuje 2 – 5 nm. Z těchto molekul příroda buduje supramolekulární struktury o rozměrech od stovek nm ke stovkám μm.



**Obr. č. 12** Struktura membránového fosfolipidu

(Chemické složení: hnědá část – cholinová skupina, béžová část – kyselina fosforečná, modrá část – glycerolová část, zelená část – rovný řetězec mastné kyseliny (nasycený), žlutá část – řetězec mastné kyseliny se záhybem (nenasycený). Záhyb obsahuje cis dvojnou vazbu a ztěžuje pohyb v laterální rovině membrány.)



**Obr. č. 13** Struktury z polárních lipidů

Přidá-li se k polárním lipidům voda, vytvoří se komplexy, ve kterých uhlovodíkové konce se vyrovnají ve vnitřní oblasti struktury a všechny ve vodě rozpustné hlavičky vytvoří povrch struktury. Vznikne typická lipidová dvojná vrstva, která je buď základ struktury buněčných membrán, nebo se vytvoří sférické micely (např. lipozom) – **obr. č. 13**. Proces vytváření lipidových vrstev probíhá samoorganizací (self-organization). Tvar dvojně vrstvy je typický pro lipidy s válcovým tvarem, mají-li lipidy kónický tvar, je jejich nejstabilnější konformací micela.

Vědecká revoluce na konci 20. století přinesla éru genomiky s jejím zaměřením na sekvencování genů a na vytváření map všech genetických informací lidí, zvířat rostlin a mikroorganismů. Po ní následuje éra proteomiky, která se zabývá identifikací proteinů v těle a stanovení jejich úlohy v životních pochodech uvnitř těl organismů<sup>36</sup>. Před námi nyní stojí nová éra, která bude zaměřena na rozpoznání úlohy lipidů. Lipidomika zahrnuje teoretické a experimentální kvantitativní studium např. samosestavování lipidů a membrán, interakce lipid – protein a lipid – gen, biofyzikální vlastnosti struktury lipidů, jejich funkce a dynamiku. Očekává se využití lipidů v nanotechnologiích.

#### 4.2.4. POLYSACHARIDY

Polysacharidy jsou biopolymery složené z makromolekul obsahujících jako monomerní jednotky výhradně jednotky odvozené od monosacharidů, které jsou spojeny glykosidovými nebo acetalovými vazbami. Polysacharidy jsou v přírodě nejrozšířenější polymery. Jsou přítomny ve všech organizmech, kde plní různé významné funkce<sup>37</sup>:

- Vytvářejí některé strukturní molekuly (celuloza, chitin, pektiny, hemicelulozy, hylauronová kyselina atd.) nebo jejich součástí (stavební glykoproteiny, glykolipidy biologických membrán, proteoglykany pojivové tkáně)
- Jsou součástí (deoxy)ribonukleosidů se podílejí na struktuře informačních molekul (DNA, RNA) a dalších látek (např. ATP)
- Tvoří pohotovou energetickou zásobu organismů (škroby u rostlin, glykogen u živočichů, sacharoza, glukóza<sup>38</sup>)
- Jsou jednou ze základních živin heterotrofních<sup>39</sup> organismů

Polysacharidy jsou ze čtyř základních molekulárních struktur nejvíce různorodé. Cukry, stavební bloky polysacharidů, jsou pokryty hydroxylovými skupinami. Polymery vznikají spojením hydroxylových skupin, čímž nabízejí mnoho možných konfigurací k polymerizaci. V přírodě je konstruováno mnoho různých lineárních a větvičích se polymerů pro různé účely. Většina polysacharidů jsou lineární polymery o tloušťce méně než 2 nm a jsou příkladem jednorozměrné nanostruktury. Jednoduchá glukóza cukru se vyskytuje v několika formách. Dvě základní jsou znázorněny na **obr. č. 14 b,c**. Chemický vzorec  $\alpha$  – glukózy je na **obr. č. 14a**. Atomy uhlíku na obr. č. 13 b,c jsou modré, atomy kyslíku zelené a atomy vodíku jsou černé. Oba druhy glukózy se liší pouze ve vazbě skupiny OH a vodíku na atomu uhlíku č. 1. (viz směry šipek). Tento malý rozdíl má však dalekosáhlé následky na strukturu vyšších sacharidů.

Je-li  $\beta$  - glukóza připojena příčnou vazbou ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), pak vytváří dlouhý rovný řetězec, který se používá pro strukturální vlákna v celulóze, jako je tomu například u pevných bavlněných vláken – **obr. č. 15**. Je-li však použita lehce odlišná příčná vazba ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ), pak řetězce tvoří

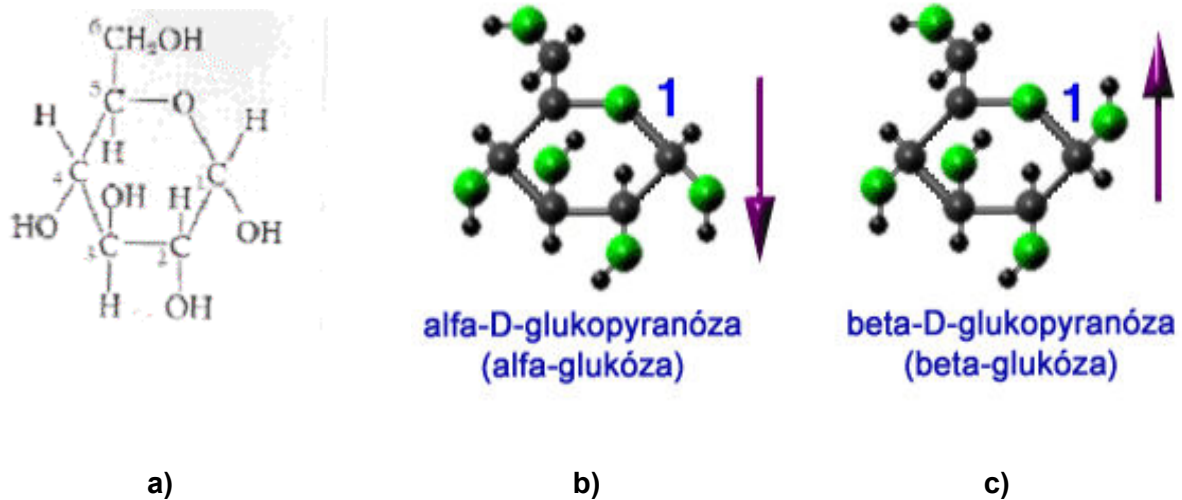
<sup>36</sup> „Co je proteomika?“, dokument Proteomické sekce ČSBMB, [www.czproteo.cz/proteomics.cs.php](http://www.czproteo.cz/proteomics.cs.php).

<sup>37</sup> Kodíček M.: „Biochemické pojmy – výkladový slovník“, vyd. VŠCHT, Praha, 2004, ISBN 80-7080-551-X

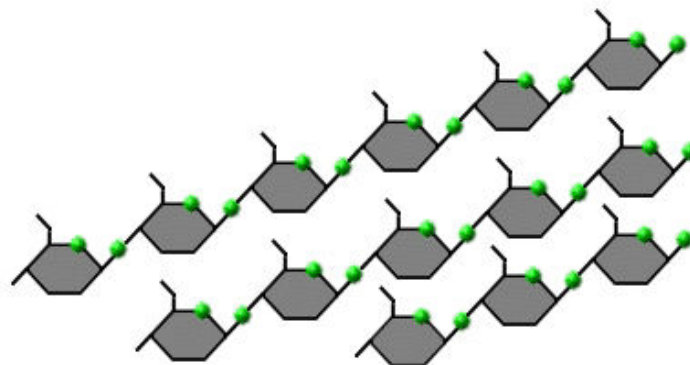
<sup>38</sup> **Glukóza** (hroznový, též krevní cukr) je monosacharid, **sacharoza** (třtinový a řepný cukr) je disacharid

<sup>39</sup> **Heterotrofie** – neschopnost organismu syntetizovat organické látky z anorganických, zejména neschopnost využít  $\text{CO}_2$  jako zdroj uhlíku (např. člověk, nezelené rostliny, mikroorganismy)

pevné svitky a vznikají zrnka škrobové moučky. Rozvětvené řetězce se také využívají k mnoha specifickým funkcím a připojují nové řetězce z mnohočetných míst do jediného bodu větve cukru. Příkladem je glykogen. Je to dendrimer složený z mnoha rozvětvených řetězců glukózy. Používá se pro skladování glukózy, takže tato pevná dendrimerická forma je kompaktní a je-li potřeba, má mnoho volných konců pro odstranění jednotlivých cukrů.



Obr.č. 14 Základní struktury glukózy



Obr. č. 15 Celuloza – lineární polymer  $\beta$  - glukózy

Mnoho hydroxylových skupin u polysacharidů vytváří vodíkové vazby s jinými donory a akceptory vodíkových vazeb, a tudíž nabízí dva způsoby interakce. V některých případech se jednotlivé řetězce polysacharidů sdružují s velkým objemem vody, a tvoří tak husté roztoky lepivého gelu. V této podobě pokrývají uhlovodíky většinu našich buněk, a utváří tak lepivý ochranný obal. Glykoproteiny ve slizu signalizují, jaké budou jejich vlastnosti. V jiných případech se uhlovodíkové řetězce spojují těsně svými bočními stranami, čímž dochází k seřazení hydroxylových skupin a ke vzniku velmi pevných vláken, které mají uvnitř jen málo vody. V této formě se polysacharidy využívají pro infrastrukturu ve velkém měřítku a ke skladování energie. Některé nejimpozantnější výtvořky biologie, včetně statných kmenů stromů a tvrdých vrchních krunýřů členovců, vděčí za svou pevnost polysacharidům.

### 4.3. BIOLOGICKÉ NANO - A MIKROSTRUKTURY

Příroda umí vytvářet materiály a molekulární stroje výjimečných vlastností spontánním sestavováním atomů a molekul způsobem, který nazýváme „zdola – nahoru“ (bottom – up). Mohli bychom jmenovat nespočetné příklady výsledných struktur, např.: mušle, perly, korály, kosti, zuby, dřevo, hedvábí, rohovinu, kolagen, svalová vlákna, hemoglobin, membránové kanály, molekulární motory, fotosyntetická reakční centra pro přeměnu světelné energie na elektrickou atd. Příroda vytváří tyto velmi různorodé objekty z malého počtu základních stavebních kamenů. Stačí jí na to 20 aminokyselin, několik nukleotidů, asi 10 lipidových molekul a kolem 20 cukrů. Z těchto zdánlivě jednoduchých stavebních kamenů jsou přírodní procesy schopny vytvořit enormní množství rozdílných strukturních jednotek. Ty se mohou dále samy sestavovat a organizovat do struktur, materiálů a molekulárních strojů, které jsou nejen vysoce přesné, pružné a schopné se opravovat, ale jsou schopné samostatně existovat nebo i dále se vyvíjet. Je proto velkou výzvou napodobovat schopnosti biologických systémů přeměňovat energii, vytvářet biomasu, ukládat informace, rozpoznávat, cítit, pohybovat se, samostatně se uspořádávat a reprodukovat. Obor, který se zabývá napodobováním přírodních materiálů, struktur a procesů se nazývá **biomimetika**<sup>40</sup>

Je pozoruhodné, že téměř bez výjimky existují biomolekulární analogy konvenčních funkčních zařízení, včetně strukturních složek, vodičů, motorů, pohonných hřídelů, potrubí, pump, výrobních linek a programovatelných řídicích systémů<sup>41</sup>. Naše současné schopnosti vytvářet jednoduché molekulární nástroje, zařízení, materiály a stroje jsou zatím primitivní ve srovnání s možnostmi přírody. Výzkum aplikací biomimetických nanostruktur a jejich aplikací se však rozvíjí se značnou intenzitou. V této kapitole upozorníme na hlavní strategie, jež používá příroda při sestavování struktur, na prostředí, ve kterém to provádí a na některé významné biologické nanostruktury a nanostroje.

#### 4.3.1. STRATEGIE VYTVÁŘENÍ STRUKTUR NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

Základním přírodním zákonem vytváření objektů a systémů ve všech měřítkách, od molekul po galaxie je jejich spontánní sestavování bez vnějšího popudu. Příklady spontánně sestavených systémů zahrnují např. hejna ryb v moři, hejna ptáků, stáda divokých zvířat, vytváření mravenišť a termišť, různé typy počasí, solární systémy, histogenezi (proces vývoje embryonálních tkání v tkáň definitivní), samovolně vytvořené monovrstvy, olejové kapky ve vodě atd.

Z termodynamického hlediska se rozlišují dva způsoby vytváření objektů a systémů:

- **samosestavování (self-assembly)**<sup>42</sup>, kdy ke spojování základních prvků dochází za podmínky termodynamické rovnováhy a v uzavřeném systému
- **samoorganizace (self-organization)**, která vyžaduje situaci daleko od termodynamické rovnováhy a je možná pouze v otevřených systémech.

<sup>40</sup> **Biomimetika** – viz např. M.Sedlák, P.Kašparová: „Biomimetika a biominerály“, Vesmír, 82, 2003, str. 616

<sup>41</sup> Wilson M. et al: „Nanotechnology – Basic Science and Emerging Technologies“, Chapman & Hall CRC, New York, 2002, ISBN 1-58488-339-1, str. 113

<sup>42</sup> V češtině není překlad pojmu „self-assembly“ ustálen. Vyskytují se následující překlady: samouspořádávání, samouspořádání, samosestavování, samosestavení, sebesestavování, samoskládání, samoskladba, sebeskladba, samovolné uspořádání, sebeutváření, autoagregace.

Anglický výraz navozuje představu mechanického (fyzikálního) procesu. Při molekulárním self-assembly však jde o složitý proces chemických vazeb ve fyzikálním prostředí při současném předávání informací, při kterém se ze základních prvků (molekul) spontánně **vytvářejí** složitější systémy. Z důvodu odlišení od strategie samoorganizace, při které dochází pouze k **uspořádání** prvků nebo struktur systému do struktur vyššího řádu, se v této práci používá pro pojem self-assembly výraz **samosestavování**.

#### 4.3.1.1. Biomolekulární samosestavování

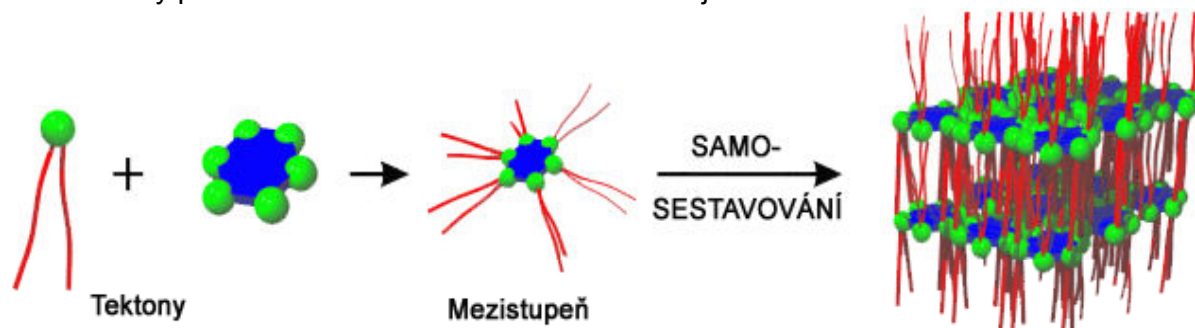
Samosestavené systémy se mohou cíleně nebo nahodile samoorganizovat do hierarchických struktur, které mohou mít formu spojení s makrosvětlem<sup>43</sup>.

Whitesides<sup>13</sup> definuje molekulární samosestavování jako „spontánní sestavování molekul za podmínek termodynamické rovnováhy do strukturovaných, stabilních, nekovalentně spojených agregátů“. Při samosestavování nedochází k ovlivňování procesu zvnějšku. Na rozdíl od samoorganizujících se struktur, struktury vzniklé při samosestavení mají přesnou strukturu, velikost a tvar. Struktury vytvořené samosestavením jsou modulární a vyžadují specifickou geometrii při interakci mezi moduly. Pro snížení objemu informací potřebných pro konstrukci, pro zajištění kontroly chyb a pro vytváření struktur se symetrickými funkčními tvary se často používá symetrických modulů.

Úspěch samosestavení v molekulárním systému je určen pěti charakteristikami<sup>44</sup>. Jsou to:

- 1) Složky systému – molekuly nebo části makromolekul, které jsou spolu v interakci. To vede od méně uspořádaného stavu (roztok, neuspořádané agregáty, náhodné svitky) ke konečnému, více uspořádanému stavu (krystal nebo složená makromolekula).
- 2) Interakce – samosestavování probíhá, jsou-li molekuly ve vzájemných vyvážených přitažlivých a odpudivých interakcích. Tyto interakce jsou všeobecně slabé a nekovalentní (van der Waalovy a Coulombovy interakce, hydrofobické interakce a vodíkové vazby). Pozorovaly se však i slabé kovalentní vazby (koordináční vazby). Komplementarita tvarů komponent samosestavování je též velmi důležitá.
- 3) Reverzibilita nebo přizpůsobivost – při vytváření uspořádaných struktur samosestavením musí být umožněno jednotlivým složkám přizpůsobit svoji polohu uvnitř vznikajícího agregátu nebo sdružování složek musí být reverzibilní. Pevnost vazeb mezi složkami musí být srovnatelná se silami majícími tendenci vazby zrušit. V případě molekul jsou síly vytvářeny tepelným pohybem. Procesy, při kterých kolize mezi molekulami vedou k nevratnému bránění pohybu složek, vytvářejí skla a ne krystaly.
- 4) Prostředí – Samosestavování molekul obvykle probíhá v roztoku nebo na rozhraní, které dovoluje požadovaný pohyb složek.
- 5) Transport hmoty a agitace – Molekuly musí být pohyblivé, aby mohlo samosestavení probíhat. V roztoku zajišťuje tepelný pohyb většinu pohybu potřebného k uvedení molekul do kontaktu. Zajištění pohyblivosti složek je velmi významnou podmínkou samosestavování.

Schematický příklad molekulárního samosestavování je na **obr. č. 16**.



**Obr. č. 16** Hypotetický proces molekulárního samosestavování

<sup>43</sup> Drain Ch.M.: „Self-organization of Self-assembled Photonic Materials into Functional Devices: Photo-switched Conductors“, PNAS, 99, 2002, str. 5178

<sup>44</sup> Whitesides G.M., Boncheva M.: „Beyond Molecules: Self-assembly of Mesoscopic and Macroscopic Components“, PNAS, 99, 2002, str. 4769

#### 4.3.1.2. Biomolekulární samoorganizace

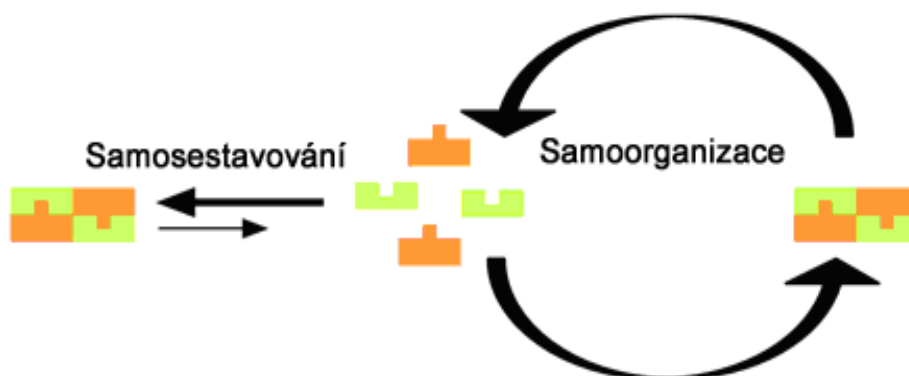
Samoorganizace, na rozdíl od samosestavení, vyžaduje situaci daleko od termodynamické rovnováhy a je možná pouze v otevřených systémech. Existuje řada definicí tohoto pojmu, např.: „Samoorganizace je spontánní rozvoj nerovnovážné struktury na makroskopické úrovni způsobený kolektivní interakcí mezi velkým počtem jednoduchých, obvykle mikroskopických objektů“<sup>45</sup>. Výsledné struktury se často nazývají disipativní struktury (mění energii v teplo) a vyžadují externí zdroj energie. Vnitřní organizace systému se automaticky zvětšuje bez toho, že by docházelo k popudům zvnějšku. Se samoorganizací se setkáváme ve fyzice, chemii, biologii, matematice a počítačových vědách i v lidské společnosti<sup>46</sup>.

Samoorganizace v oblasti buněčné biologie (molekulární samoorganizace) může být definována jako kapacita makromolekulárního komplexu nebo organely určit svou strukturu založenou na funkční interakci svých složek<sup>47</sup>. Procesy probíhající uvnitř samoorganizované struktury nejsou podporovány žádnou pevnou kostrou, spíše určují její organizaci.

Typickým příkladem samoorganizace je cytoskelet v buňce (**obr. č. 28**). Cytoskelet je složitá síť proteinových vláken v cytoplasmě eukaryotní buňky, který buňce zajišťuje polární tvar a schopnost řízeného pohybu. Nejhojnějšími složkami cytoskeletu jsou aktinová vlákna, mikrotubuly a intermediární filamta. Cytoskelet se však nepadobá kostře našeho těla, ale je to vysoce dynamická struktura, která je neustále reorganizována během toho, jak buňka mění tvar, dělí se nebo reaguje na změny ve svém okolí. Vazby mezi složkami samoorganizující se struktury jsou nekovalentní.

Samoorganizace je perfektní strategie pro vytváření struktur, které jsou pružné, houževnaté a samoopravitelné. Samoorganizované systémy nemají vnitřní kontrolu procesu, a proto vzniklé struktury mají vždy určitý stupeň volnosti, např. velké přesně nedefinované povrchy, což umožňuje množství interakcí podobného charakteru sousedních modulů.

Rozdíl mezi samosestavováním a samoorganizací je schematicky znázorněn na **obr. č. 17**.



**Obr. č. 17** – Samosestavování versus samoorganizace

*Při samosestavování se jednotlivé složky sestavují do stabilní statické struktury, která je v termodynamické rovnováze. Při samoorganizaci se složky uspořádávají do stále se vytvářející dynamické struktury.*

<sup>45</sup> Coveney P., Highfield V.: „Frontiers of Complexity“, Fawcett Columbine, New York, 1995, str. 432.

<sup>46</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Self\\_organization](http://en.wikipedia.org/wiki/Self_organization)

<sup>47</sup> Misteli T.: „The Concept of Self-organization in Cellular Architecture“, J.Cell Biology, 155, 2001, str.181



### 4.3.2. BIOLOGICKÉ PROSTŘEDÍ V NANOROZMĚRECH

Biologické stroje se odlišují od jakýchkoli strojů, které konstruujeme pomocí našich důvěrně známých technologií, jež svými rozměry odpovídají lidským požadavkům. Přírodní biomolekuly jsou organické, útrobní a často mají ty nejneuvěřitelnější tvary, narozdíl od designersky upravených tvarů lidských výtvorů. Vykonávají svou práci v cizím prostředí, kde konstantní pohyb tepla působí, že dílčí součásti těchto biomolekul jsou tímto pohybem neustále roztahovány a tlačeny. Tyto biomolekuly drží pohromadě složitým komplexem vazebních a nevazebních sil. Protože se nacházejí v malé rozměrové škále, jsou téměř imunní k zákonům přitažlivosti a setrvačnosti, které na lidmi vytvořené stroje působí. V tomto nano a mikrosvětě platí odlišná pravidla

#### 4.3.2.1. Přitažlivost a setrvačnost

Na makroskopické objekty působí vlastnosti hmoty. U objektů, jejichž velikost se pohybuje v centimetrech nebo metrech, jsou fyzikální vlastnosti jako je tření, pevnost v tahu, přilnavost a pevnost ve smyku srovnatelné co do velikosti se silami, které vyvolává setrvačnost a přitažlivost. Tato rovnováha se však mění, směřujeme-li k větším nebo menším objektům. Přejdeme-li k větším objektům, zjistíme, že zákony změny měřítka tuto rovnováhu mění. Hmota narůstá s krychlovým objemem velikosti objektu a vlastnosti jako je pevnost a tření se zintenzívňují lineárně nebo s čtvercem velikosti. U tak velké struktury, jakou představuje budova, může navýšení setrvačnosti nebo hmotnosti rychle zvítězit nad její stoupající pevností. Tyto zákony změny měřítka jsou známé a nemůžeme budovat libovolně velké či vysoké stavby.

Tyto zákony změny měřítka platí i v opačném směru, a když směřujeme k menším a menším objektům, mají opačný účinek. Objekty na mikrometrické úrovni, jako jsou jednotlivá zrna písku nebo jednotlivé buňky, již reagují jinak než objekty na makrometrické úrovni. Setrvačnost zde již není důležitou vlastností, takže naše intuice nás může zavést k nepatřičným závěrům. Např. uveďme překvapivé vlastnosti buněk bakterií, které plavou ve vodě. Tyto buňky využívají dlouhého spirálovitého bičíku, aby se jím samy poháněly ve vodě. Když buňka přestane otáčet bičíkem, mohli bychom očekávat, že pomalu sjede dolů a zastaví jako to dělá ponorka v oceánu. Vzhledem k tomu, že měřítka setrvačnosti ve vodním prostředí mají k viskózním silám odlišnou souvztažnost, buňka se vlastně zastaví na vzdálenost menší, než je průměr jednoho atomu<sup>48</sup>.

Přitažlivost je rovněž zanedbatelnou silou v tom případě, když se zabýváme malými objekty. Na činnost malých objektů působí jejich interakce se sousedícími objekty. Molekuly ve vodě a ve vzduchu jsou v neustálém pohybu a stále bombardují malé objekty ze všech stran. Jemný prach tak zůstane viset ve vzduchu namísto toho, aby rychle spadl na podlahu a objekty ve vodě, díváme-li se na ně mikroskopem, vykonávají náhodný Brownův pohyb. Přitažlivé síly působící mezi malými objekty jsou rovněž silnější než síly gravitace. Mouchy i gekoni využívají těchto přitažlivých sil, a proto umí šplhat po stěnách. Podobně je tomu u kapek vody, které mohou viset ze stropu vlivem působení těchto přitažlivých sil.

#### 4.3.2.2. Tepelný pohyb

Příroda vytváří přesné bionanomateriály a bionanostroje na molekulové úrovni, které pak uzavírá do buněčného prostoru. Jednotlivé části pak vzájemně reagují prostřednictvím náhodného pohybu a difuze. Bionanostroje pracují v chaotickém prostředí. Jsou neustále bombardovány molekulami vody. Nejsou-li pevně vázány na jednom místě, zcela náhodně

<sup>48</sup> Goodsell D.S.: „Bionanotechnology“, vyd. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2004, str.11, ISBN 0-471-41719-X

se rozptýlí. Bionanostroje pracují tak, že vytvářejí interakce s jinými bionanostroji, v průběhu své činnosti zapadnou do sebe a pak se od sebe odtrhnou. Jestliže dvě molekuly zapadají těsně do sebe a hodí se k sobě dobře i svými chemickými skupinami, budou spolu vzájemně reagovat po dlouhou dobu. Jsou-li jejich interakce slabší, budou navzájem reagovat pouze dočasně a následně se pak přesunou k dalším molekulám. Při pečlivě provedené konstrukci, týkající se pevnosti těchto interakcí, mohou bionanostroje vytvořit stabilní molekulární spojníky (linkery), které vydrží celé roky, nebo citlivé senzory, které vycítují prchavé stopy mnoha molekul.

Buňky jsou složité, obsahují milióny proteinů. Otázkou je, zda difúzní pohyb stačí na to, aby v tomto množství byla možná interakce mezi těmi správnými partnery. V rozměrové škále buňky je však difúzní pohyb pozoruhodně rychlý. Uvolní-li se uvnitř buňky typický protein, je velice pravděpodobné, že během jedné setiny vteřiny se bude nacházet kdekoli v buňce a je velmi pravděpodobné, že dojde k žádoucí interakci.

#### **4.3.2.3. Vodní prostředí**

Tvar a funkci biomolekul řídí dvě věci: chemická vazba jejich atomů a neobvyklé vlastnosti vody, která tyto biomolekuly obklopuje. Energetika této interakce je zcela odlišná od čehokoliv, s čím máme zkušenost v našem makroskopickém světě.

Voda je neobyčejná substance a má specifické přednosti. Molekuly vody velice silně reagují spolu navzájem prostřednictvím vodíkových vazeb. Neoddělují se snadno a nereagují vzájemně s jinými molekulami, pokud jim tyto jiné molekuly nemají co nabídnout. V biomolekulách jsou oblasti, které mají nabitě elektrony a oblasti, bohaté na výskyt atomů dusíku a kyslíku; tyto oblasti reagují příznivě s vodou. Snadno se rozptýlí do vodního roztoku. Oblasti, které jsou bohaté na uhlík, však nemohou vytvářet nezbytné vodíkové vazby a mají tendenci se shlukovat do olejových kapek, čímž se minimalizuje jejich kontakt s okolním vodním prostředím. Tento proces byl nazván termínem "hydrofobický efekt", přičemž název "hydrofobický" se vztahuje k atomům uhlíku. Hydrofobický efekt působí velmi silně na tvar a funkci biologické molekuly. Samotná geometrie molekulárního řetězce umožňuje vytváření mnoha typů struktur. Kdyby to však bylo všechno, nebyl by možný život - řetězce by pouze vzácně vytvořily samostatnou jasně vymezenou strukturu. Když jsou biomolekuly umístěny do vody, reagují na okolní prostředí tak, že se poskládají do struktury, která má hydrofobické oblasti zasunuty dovnitř a na povrchu této struktury se vyskytují různé skupiny, které se vážou na vodu. U proteinů je řetězec nejčastěji stlačen do kompaktní globule. U DNA jsou páry báze bezpečně izolovány uvnitř, přičemž silně nabitě fosfáty zůstávají na povrchu. U lipidů je mnoho jednotlivých molekul stlačeno dohromady, aby vytvořily membrány, a jejich hydrofobické atomy jsou uloženy jako sendvič mezi vrstvami nabitých atomů, které mají rády vodu. Jsou-li vytvořeny bez vad (tak jako je tomu s velmi vysokou pravděpodobností u všech přírodních biologických molekul), vzniká kompaktní jediná struktura, kterou je bionanostroj s takovou stavbou, jež je pro vykonávání jeho práce nejlepší.

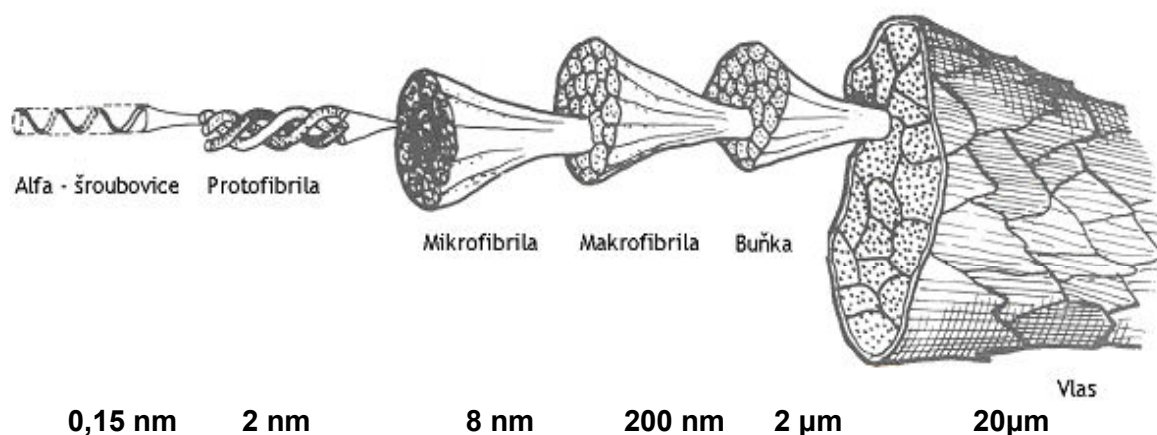
#### **4.3.3. HIERARCHICKÉ USPOŘÁDÁNÍ**

Biomolekuly vytvářejí struktury, které jsou ideální pro aplikace v nanotechnologiích pro svoji schopnost rychlé, kontrolovatelné hierarchické montáže. Hierarchie biologických struktur začíná monomerními molekulami (např. nukleotidy, aminokyseliny, lipidy), které vytvářejí polymery (např. DNA, RNA, proteiny a polysacharidy), poté vyšší celky (např. membrány a

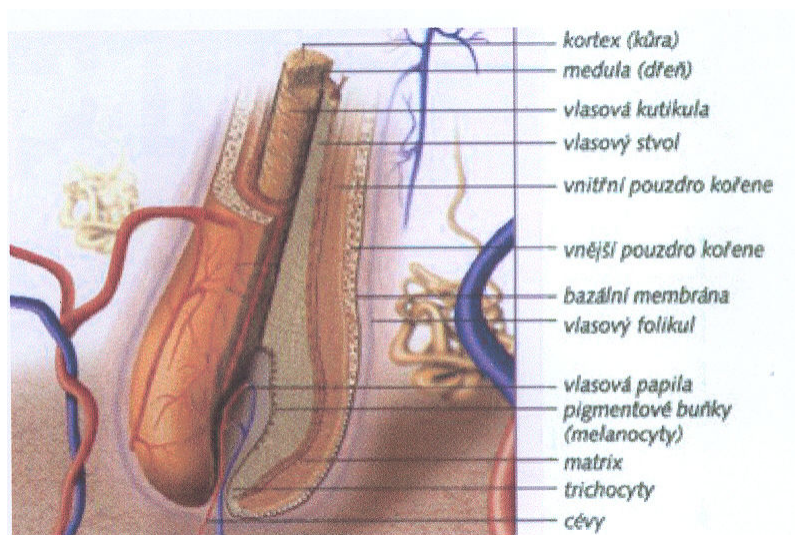
orgány) a konečně buňky, orgány, organizmy a pak celou populaci. Jak bylo uvedeno, základní technologií vytváření hierarchických biologických struktur je samosestavování.

Příkladem hierarchické struktury je **vlas** (chlup, srst) – **obr. č. 18**<sup>49</sup>. Vlas je biologický polymer. Přes 90 % jeho suché hmotnosti tvoří protein keratin. Za normálních podmínek obsahuje vlas cca 10 % vody, což významně modifikuje jeho mechanické vlastnosti. Základní strukturou je  $\alpha$ -šroubovice keratinu (viz **obr. č. 10**). Tři řetězce keratinu jsou svinuty do protofibrily. Seskupení těchto molekul tvoří mikrofibrily (mikrovlákno, správně – nanovlákno). Tyto mikrofibrily vytvářejí velké fibrily (makrofibrily). Keratinové fibrily pak tvoří buňky (vrstvy či lamely) vřetenovitého tvaru, které vytvářejí vnitřní vrstvu vlasu – kortex – viz **obr. č. 19**. V kortexu se nacházejí pigmentová zrnka (melanocyty).

Vnější ochranné vrstvy vlasu – kutikuly (lidský vlas jich má 6 – 8), jsou tvořeny bezbarvými buňkami. Kutikuly regulují chemické napadení vlasu, jeho poškození a chrání vlas před přehřátím či vysušením. Buňky kutikul se navzájem překládají, jako střešní tašky – **obr. č. 20**.

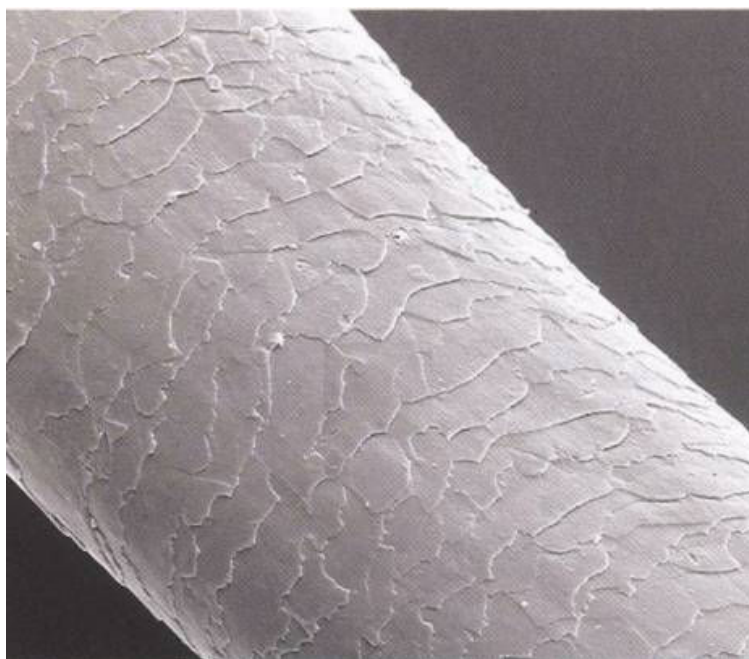


**Obr. č. 18** Hierarchická struktura vlasu



**Obr. č. 19** Schéma uložení vlasu v kůži

<sup>49</sup> Vincent J.: „Materials Technology from Nature“, Metals and Materials, 1/1990, str.7



**Obr. č. 20** Povrchová struktura povrchu vlasu

Jsou navzájem propojeny zvláštním tmelem obsahujícím proteiny a lipidy. Centrální dutou částí vlasu je dřev (medula), která slouží k vyživování vlasu a ovlivňuje lesk vlasu. Vzniklá struktura je velmi pružná a relativně pevná. Je schopná samostatného růstu (rychlost růstu je přibližně 11 cm ročně, tj. 3 nm/sec.) a sama se opravuje. Uvedený příklad patří mezi „jednoduché“ struktury, které příroda utváří, nicméně, jde o složitý biologický systém, splňující řadu funkcí. Další informace o vlasech lze nalézt např. v časopise 21. století<sup>50</sup>.

#### 4.3.4. BIOMINERALIZACE

Základní složky v molekulárních systémech mají rozměry menší než 1 nm nebo ve spodní části nanometrické škály (**Tab. č. I**). Příroda nám ukázala, že samosestavováním je možné vytvářet z těchto základních kamenů objekty větších systémech, v měřítku nanometrů, mikrometrů i ve větších rozměrových škálách – **obr. č. 18**. Pro vytváření ohromujícího množství živých forem používá příroda přitom jen několik druhů materiálů. Za příklad může sloužit protein kolagen<sup>51</sup>, který je přírodou používán různými způsoby pro řešení velmi rozmanitých úkolů. Přírodní materiály jsou většinou složeny z organických a anorganických krystalů a z amorfni fáze. Organická fáze všeobecně zaujímá jen malou část celkového objemu a má funkce sahající od utužování tkání po syntetizování vysoce funkčních minerálů.

Anorganickou složku mohou tvořit monokrystaly nebo agregáty vysoce uspořádaných souborů, umožňující vytváření hierarchické struktury v různých délkových škálách. Z hlediska vlastností tohoto kompozitu má prvořadý význam rozhraní mezi měkkou organickou hmotou a relativně tvrdým anorganickým materiálem. Pro zajištění integrity rozhraní za daných napěťových podmínek používá příroda různé strategie.

Za účelem syntézy funkčních organicko-anorganických materiálů vyvinula příroda nový druh chemie, který sloučil syntézu a konstrukci „tvrdé“ anorganické a „měkké“ organické hmoty.

<sup>50</sup> M.Koukal „Vlasy, chlupy, nehty, srst“, 21. století, březen 2005, str. 68

<sup>51</sup> **Kolagen** je vláknitý strukturální protein. Je hlavní složkou extracelulární matrix v tkáních. Existuje v celé řadě forem, nejčastěji jako typ I v kůži, šlachách a kostech, jako typ II v chrupavce, jako typ IV v bazálních laminách (druh membrány oddělující např. svalové buňky od pojivové tkáně).

Tuto vědu uplatnila příroda při vytváření tvrdých součástí živých organismů jako jsou např. makroskopické struktury ústřic, korálů, slonoviny, kostí a zubní skloviny. Použitá technologie se nazývá biomineralizace.

**Biomineralizace** je proces, při němž organismy produkují anorganické látky, tzv. biogenní minerály, které se stávají součástí jejich organismu. Biogenní<sup>52</sup> minerály (biominerály) se nejčastěji podílejí na složení schránek (sloužících jako ochrana před predátory a jako opora těla) nebo vnitřních koster (tvořících oporu měkkého těla). Člověk a všichni savci mají ve svých kostech a zubech kalcit a apatit. Měkkýši si vytvářejí vápnité schránky a slepice "vyrábí" kalcit, ze kterého jsou složeny vaječné skořápky. Většina korálů chrání své tělo kostrami z aragonitu. Některé organismy mají malé krystalky minerálů v rovnovážných orgánech. Pomocí nich vnímají polohu těla. Přesličky pro zpevnění ukládají ve svých tělech mikroskopické krystalky křemene. Ne všechny biominerály jsou v organismech žádoucí, např. biominerál monohydrát šťavelanu vápenatého je hlavní složkou močových kamenů. Přehled hlavních minerálů vytvářejících se samosestavováním v živých organismech je uveden v **Tab. č. III.**

V uplynulých 25 letech se biomineralizace stala středem pozornosti zejména pro unikátní vlastnosti biomateriálů – kompozitů biogenních minerálů, organické krystalické a amorfní fáze. Účast biomolekul na nukleaci a růstu krystalů evokovala zajímavé otázky související s molekulárním rozpoznáváním.

Kontrola rozměrů krystalů přírodou, jejich tvaru a krystalografické orientace je neobyčejná a výsledné vlastnosti jako např. vysoká pevnost, odolnost proti lomu i estetický vzhled jsou atributy, které jsou hnací silou dalšího zkoumání.

Ačkoliv spojení organických látek s biologicky vyrobenými minerály bylo dokumentováno již před dlouhou dobou, teprve v poslední době byla vytvořena určitá koncepce, která dovoluje vysvětlení překvapujícího kontrastu mezi morfologickou rozdílností a udivující specifičností biomateriálů v kostrách bezobratlých, ve srovnání s extrémně nízkým počtem minerálů účastnících se na procesu (nejvíce uhličitán vápenatý, fosforečnan vápenatý a hydrátovaný oxid křemičitý).

V současné době se do určité míry porozumělo tomu, jak živé organismy řídí růst mikrostrukturálních jednotek při vytváření tvrdých částí. Byly identifikovány dva hlavní aspekty tohoto procesu – tvorba vysoce specializovaných organických makromolekul (většinou extracelulárních) a stálá interakce mezi organickými sloučeninami a rostoucí minerální fází. V průběhu iniciace procesu, kdy nově vzniklé biominerály nukleují na čistě organickém templátu a v následující fázi růstu (obvykle polycyklické, rezultující v krystaly dlouhé až několik mm) je vývoj biominerálů stále kontrolován specificky vznikajícími organickými molekulami, které v nich zůstávají zachyceny.

Tento biologicky řízený růst je hlavním faktorem způsobujícím morfologickou různorodost a specifičnost složení biomateriálů a je též zodpovědný za specifické geologické chování, které se projevílo v průběhu procesu fosilizace.

Jednou z velkých výzev materiálové vědy je stanovení mechanismů, kterými živé organismy řídí syntézu materiálu. Je to klíč k velmi rozličným problémům, od biomimetické syntézy nanostruktur k porozumění původu života na Zemi.

Je pozoruhodné, že přírodní živé systémy při své syntéze sledují nejen optimální spotřebu energie, svoji integritu a využití prostoru, ale i řadu jiných funkcí. Např. pera, vedle své hlavní funkce pomáhat ptákům létat, mají za úkol izolovat je od prostředí. Ryby snižují odpor proti svému pohybu jak chemickými, tak konstrukčními opatřeními.

---

<sup>52</sup> **Biogenní** – vzniklý za účasti živých organismů

**Tab. č. III** Přehled hlavních minerálů v živých organizmech a jejich funkce

Biogenické minerály	Vzorec	Organismus	Biologický výskyt	Biologická funkce
Uhličitany vápenaté (kalcit, vaterit, aragonit, Mg-calcit, amorfní)	$\text{CaCO}_3$ (Mg,Ca) $\text{CO}_3$ $\text{CaCO} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Mnoho mořských organismů, Aves, rostliny, savci	lastury ,ulity, oční čočky, krabí kutikula, skořápky, listy, vnitřní ucho	exoskeleton, optické, mechanická pevnost, ochrana, receptor gravitace, plovací systémy, úložiště Ca
Fosforečnany vápenaté (hydroxyapatit, dahllit)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$ $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	Obratlovci, savci, ryby, dvouskořepinové mušle	kosti, zuby, šupiny, žábry, mitochondrie	endoskeleton, skladování iontů, řezání/drcení, ochrana, prekuzory
Šťavelany vápenaté (whewellit, wheddellit)	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Rostliny, houby, savci	listy, stélky hub, močové kameny	ochrana/zastrašování, uskladňování/odstraňování vápníku, patologická funkce
Oxidy železa (magnetit, goethit, lepidokrokit, ferrihydrit)	$\text{Fe}_3\text{O}_4$ a- $\text{FeOOH}$ , g - $\text{FeOOH}$ $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Bakterie, chitoni, tuňák/losos, savci	uvnitř buněk, zuby, hlava, vlákna, ferritin	magnetická orientace, mechanické pevnost, ukládání železa
Sírany (sádra, celestit, baryt)	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{SrSO}_4$ $\text{BaSO}_4$	Medúza, Acantharia (mřížovci), Loxodes (zobánka)	smyslové orgány korýšů, statolity	indikace zemské tíže, kostra
Halidy (fluorit, hieratit)	$\text{CaF}_2$	Měkýši, korýši	smyslové orgány korýšů	drcení, indikace zemské tíže
Sulfidy (pyrit, sfalerit, würtzit, galenit, greigit)	$\text{FeS}_2$ $\text{ZnS}$ , $\text{PbS}$ $\text{Fe}_3\text{S}_4$	Thiopneutes (baktérie)	buněčné stěny	snižování obsahu síry, odstraňování iontů
$\text{SiO}_2$ (křemen)	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Diatomy, Radiolaria (mřížovci), rostliny, atd..	buněčné stěny, buňky, listy	exoskeleton, skelet, ochrana

Některé uvolňují látky, které působí, že jejich kůže je kluzká. U jiných je jejich tělo uspořádáno tak, aby se omezovaly turbulence při plování. Uvnitř sépie je nádrž rozdělená na další prostory, naplněná dusíkem nebo vodou, která jí umožňuje se vznášet a úsporně se pohybovat v různých hloubkách.

Struktura nádrže umožňuje sépii odolávat vnějším tlakům až 7 atm. Přírodní materiály se samy utvářejí, jsou hierarchické, multifunkční, nelineární, kompozitní, adaptivní, samoopravitelné a biodegradabilní. Uvádíme dva příklady biomineralizace s využitím přírodních nanotechnologií.

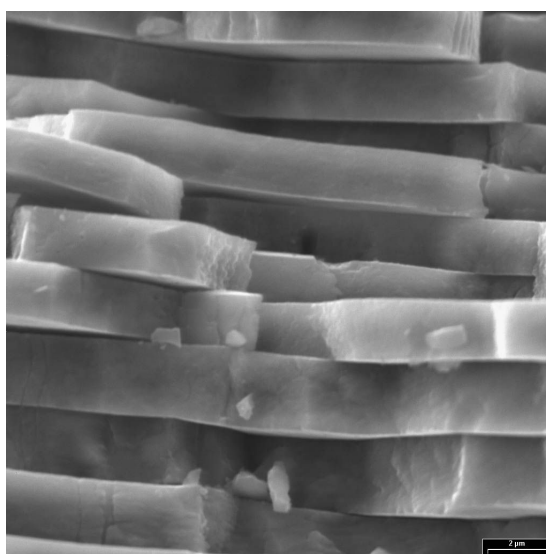
#### 4.3.4.1. Plž – Ušeň mořská

Ušeň mořská (angl. Abalon, *Haliotis tuberculata*) je malý měkkýš z třídy plžů, který si konstruuje superpevnou skořápku s krásným, duhově zbarveným vnitřním povrchem – **obr. č. 21**. Provádí to tím, že uspořádává uhličitan vápenatý (křídou) do pevných nanostrukturálních bloků – **obr. č. 22**. Jako maltu používá měkkýš pružný sliz, směs proteinů a uhlohydrátů. Trhliny, které se mohou iniciovat na povrchu skořápky, jen obtížně pronikají dovnitř.

Struktura skořápky ztěžuje pronikání trhliny, jejíž dráha je při překonávání jemných bloků klikatá a dochází tak k rozptýlení energie potřebné k lomu. Významnou roli sehrává i pružná malta. Jak trhlina roste, malta vytváří houževnaté nanostruny, které se snaží zamezit jakémukoliv vzájemnému oddálení nanobloků. Výsledkem je liliputánská konstrukce, která může odolat ostrým zobákům, zubům, případně i úderům kladiva. Chytré uspořádání měkkýšovy skořápky naznačuje jednu z nejvíce zajímavých možností nanotechnologie – vytvářením nanostruktur je možné řídit základní vlastnosti, jako např. barvu, elektrickou vodivost, teplotu tání, tvrdost, odolnost proti trhlinám a pevnost, bez změny chemického složení materiálu. V případě plžů se měkká křída mění v tvrdou skořápku.



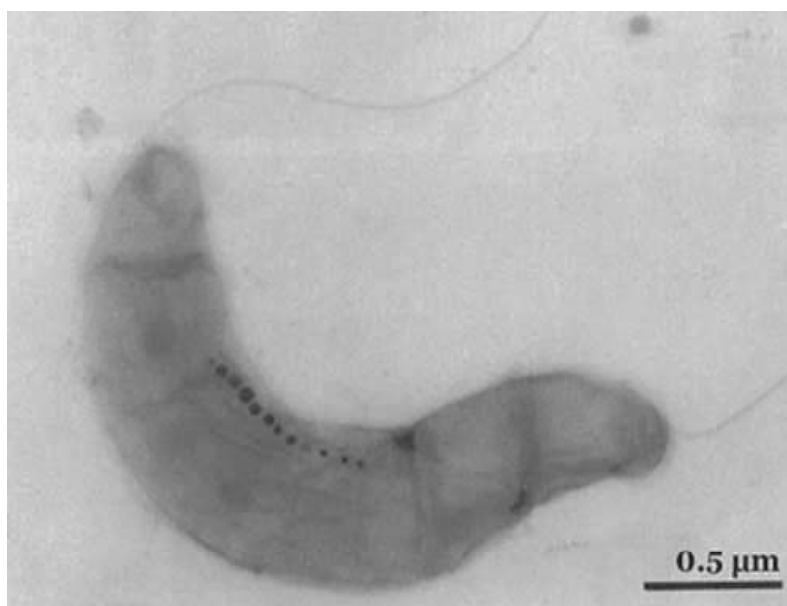
**Obr. č. 21** Ulita ušně mořské (velikost 3x5 cm)



**Obr. č. 22** Vrstvy nanobloků uhličitanu vápenatého

#### 4.3.4.2. Magnetotaktická bakterie

V roce 1962 objevil H.A. Lowenstam první biochemicky precipitovaný (biomineralizovaný) magnetit, který sloužil jako radula<sup>53</sup> zubů chitonů<sup>54</sup> a v roce 1975 R.Blakemore magnetotaktickou bakterii, která je nyní objektem intenzivního zkoumání. Bakterie si vytváří sférické krystality magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o rozměru cca 50 nm – **obr. č. 23**<sup>55</sup>, které jsou přesně orientované a předávají jí magnetický moment rovnoběžný s její osou pohyblivosti. Řetízky částic nazývaných magnetosomy slouží jako jednoduché strelky kompasu, které pasivně zkrucují buňky bakterie, aby byly vyrovnány souběžně se zemským magnetickým polem a bakterie tak mohla snáze najít její nejpřírozanější prostředí – mikroaerofilní zónu na rozhraní kal/voda. Je zajímavé, že tyto bakterie plavou na severní polokouli vždy k severnímu magnetickému pólu a na jižní polokouli k jižnímu magnetickému pólu.



**Obr. č. 23** Bakterie *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Úsečka značí 500 nm.

#### 4.3.5. BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY

Biologická membrána je tenká vrstva lipidových molekul a připojených proteinů, která obklopuje každou buňku (plazmatická neboli buněčná membrána) a tvoří hranici mnoha buněčných organel. Zjednodušené schematické znázornění biologické membrány je na **obr. č. 24**. Je to 6 – 10 nm tlustá buněčná struktura tvořená dvojvrstvou polárních lipidů, do níž jsou začleněny membránové proteiny. Polární lipidy jsou orientovány tak, že jejich hydrofobní řetězce směřují dovnitř membrány a hydrofilní polární hlavice ven, kde interagují s vodou.

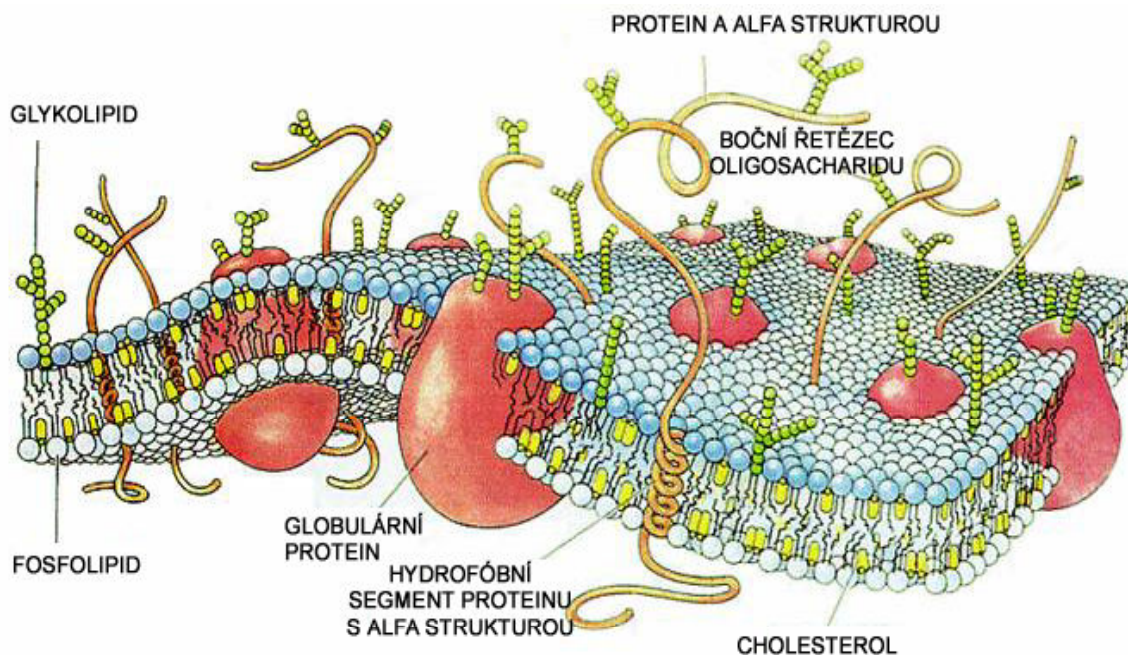
Díky hydrofobním interakcím je tato struktura dosti stabilní, přičemž jednotlivé molekuly polárních lipidů se mohou celkem volně pohybovat do stran (laterální difuze); za fyziologických podmínek jsou lipidy ve formě tzv. dvojrozměrné kapaliny.

<sup>53</sup> Radula je rohovitá páska v ústní dutině plžů

<sup>54</sup> Chiton je mořský plž třídy Polyplacophora

<sup>55</sup> Šafařík I., Šafaříková M.: „Magnetic Particles and Biosciences“, Monatshefte für Chemie, 135, 2002, str. 737





**Obr. č. 24** Příklad struktury buněčné membrány

Vlastnosti biologických membrán jsou společné jak pro plazmatické membrány buněk tak pro membrány buněčných organel:

- Neprostupnost pro polární molekuly a ionty. Membrány umožňují průnik těchto látek v případě, že jsou vybaveny proteinovými transportéry nebo se jedná o specializované membrány (membrána jadra, vnější membrána mitochondrií).
- Membrány nejsou rigidní útvary, ale jsou schopny flexibilní adaptace podle změny tvaru a objemu buněk nebo organel.
- Membrány jsou dostatečně odolné proti poškození a jsou schopny při vnějším zásahu obnovit svou integritu.
- Membrány mají uniformní vzhled, který se v elektronovém mikroskopu jeví jako dvě tmavé linie oddělené třetí, světlejší střední linií.
- Membrány obsahují proteiny, jejichž funkce není pouze strukturální, ale vykazují řadu aktivit. Jejich vlastnosti a množství se liší podle specializace buněk a mohou se měnit v závislosti na změnách podmínek prostředí.

**Membránové lipidy** tvoří fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol. Fosfolipidy jsou v plazmatické membráně rozloženy asymetricky. Cholinové fosfolipidy tvoří vnější stranu dvojvrstvy, aminofosfolipidy vnitřní (cytoplasmatickou) stranu. Glykolipidy se nalézají na vnější straně s jejich cukernou složkou vyčnívající z povrchu buňky. Lipidy mohou volně difundovat v matrixi membrány, pokud jejich pohyb není omezen asociací s jinou složkou membrány.

**Membránové proteiny** uskutečňují velké množství specifických procesů, typických pro membrány, takže se mnoho proteinů buňky vyskytuje pouze v membránách. Příkladem membránových proteinů jsou transportéry ( $\text{Na}^+\text{K}^+$ ) nebo ATPasové pumpy, spojky, receptory, enzymy, povrchové antigeny atd. Dělíme je na dvě velké skupiny:

- integrální proteiny, které jsou od membrány těžko oddělitelné, mají jeden nebo více segmentů, významně interagují s hydrokarbonovým koncem lipidů a napínají tak

lipidovou dvojvrstvou. Transmembránové proteiny jsou integrální proteiny prostupující celou membránou. Jsou uspořádány do  $\alpha$ -šroubovice a mají délku kolem 3 nm (tj. 0,15 nm na jeden aminokyselinový zbytek), tedy délku nutnou pro kolmý průchod membránou (viz **obr. č. 24**). Integrální proteiny mohou (ale nemusejí) procházet lipidovou dvojvrstvou.

- periferní proteiny, které neinteragují přímo s hydrofobním jádrem fosfolipidové dvojvrstvy, ale jsou napojeny vodíkovou vazbou nebo elektrostatickými silami na povrchu buňky k integrálním proteinům nebo k polárním lipidovým hlavám.

Struktura membrán je dynamická, tj. její složky jsou v neustálém pohybu. Možnost pohybu některých složek membrány je velmi důležitá pro funkci buněk. Faktory, které vedou k omezení fluidity, mají vliv na její funkci. Fluidita závisí především na uspořádání a interakcích řetězců mastných kyselin v membránových fosfolipidech. I když pohyb proteinů v membráně je velmi limitován, a to pro jejich specifickou funkci, která vyžaduje určitou lokalizaci, podléhají určitému pohybu v lipidové matrix, který je řádově pomalejší, než je tomu u menších lipidových molekul. U vývojově vyšších živočichů redukuje membránovou fluiditu cholesterol.

#### 4.3.6. MOLEKULÁRNÍ KANÁLY A PUMPY

Ze strukturálního hlediska je jedním z nejvíce fascinujících rysů u buněčných systémů to, že jsou rozděleny na množství oddělených komor zapuštěných do membrány. To, že takové útvary, které jsou často nápadné velkými koncentračními gradienty se zřetelem na okolní médium, existují, ukazuje na další div nanotechnologie v živém světě, konkrétně na přítomnost široké škály transmembránových kanálů, které zprostředkovávají výměnu materiálu mezi oddělenými komorami. Určité pasivní verze těchto kanálů jsou uzavírány pomocí různých mechanismů jako třeba příchodem signálních molekul nebo napětím v membráně, uvnitř které se nacházejí. Jakmile se kanál nachází v otevřeném stavu, ionty jím procházejí pasivně vlivem difúze. Aktivní verze iontových kanálů, které přepravují ionty jako jsou  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ , jsou rovněž zásadní pro funkci buňky, a to jak u jednobuněčných, tak i vícebuněčných organismů. V případě iontů  $\text{Na}^+$  mohou být například jejich typické koncentrace uvnitř buňky až 10 - 20 krát menší než je tomu v mimobuněčném prostředí.

Takové koncentrační gradienty nutně potřebují sofistikovaná aktivní „zařízení“, která pracují proti takovým gradientům. Jedním z nejpozoruhodnějších strojů tohoto typu je sodíko-draslíková pumpa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . Tento stroj je poháněn hydrolyzou ATP (tj. spotřebou ATP paliva) a může pumpovat ionty až na potenciální gradient. Tato pumpa konkrétně hydrolyzuje ATP a pumpuje ionty  $\text{Na}^+$  ven z buňky proti velmi vysokému koncentračnímu gradientu, zatímco *dovnitř* pumpuje ionty  $\text{K}^+$ , a to opět proti strmě vysokému gradientu.

#### 4.3.7. MOLEKULÁRNÍ MOTORY

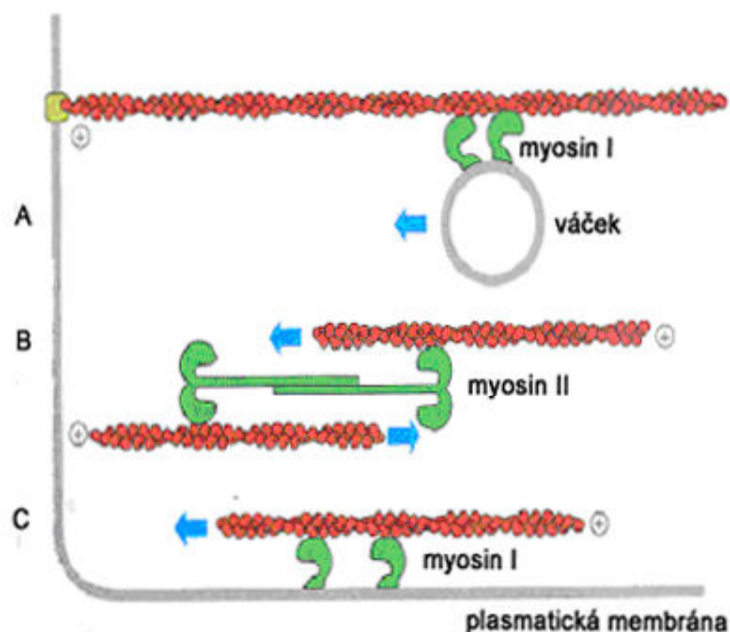
Pro vytváření a udržování vnitřní organizace je nezbytné v buňce dopravovat různé větší či menší buněčné složky (náklad) z místa na místo (např. vezikuly, melanosomy a RNA). K tomu slouží různé molekulární motory (motorové proteiny). Jsou to převážně enzymy, které zajišťují pohyb v biologických systémech. Tyto molekuly přeměňují chemickou energii ve formě ATP<sup>56</sup> na mechanický pohyb. V posledních 40 letech bylo objeveno velké množství

---

<sup>56</sup> **ATP** – adenosintrifosfát, je nejdůležitější energetický metabolit buněk ze skupiny adenosinfosfátů.

molekulárních motorů pracujících v buňkách živočichů, rostlin a bakterií. Mezi biologicky významné molekulární motory patří:

- **Myosiny**, využívající hydrolýzy ATP k pohybu v buňkách podél **aktinových vláken** (viz 4.3.8.) k jejich + koncům. Je to široká rodina molekulárních motorů, které se dnes rozděluje na 24 skupin a řadu podskupin. Většina myosinových motorů se skládá ze dvou částí - hlavy a ocásku. Hlavová část se váže k aktinovým vláknům a na část ocásku se váže dopravovaný náklad. Kroky o délce 5 – 25 nm jsou schopny přenášet na krátkou vzdálenost organely podél aktinových svazků, které se vyskytují v celé buňce, ale zejména ve vysoké koncentraci v blízkosti buněčné membrány. Některé funkce myosinu I a myosinu II v eukaryontních buňkách jsou znázorněny na **obr. č. 25**<sup>57</sup>. **Myosin I**, je jednořetězcová molekula o délce cca 70 nm s jednou globulární hlavičkou a ocáskem, který se váže k jiné molekule, k buněčné organelle nebo i membráně – **obr. č. 25 a,c**. Na obr. č.25 a) přenáší myosin I podél aktinového řetězce vezikulu (váček), na obr. č. 25 c) posunuje myosin I aktinové vlákno podél stěny membrány. Myosin I vždy putuje k + konci aktinového vlákna. **Myosin II**, který odpovídá za kontrakci kosterních svalů, je složen ze dvou identických myosinových molekul. Má tedy dvě globulární hlavičky a řetězec o délce cca 150 nm ve formě stočené šroubovice – **obr. č. 25 b**. Konce myosinu II se mohou navzájem propojit a vytvořit myosinové vlákno, ze kterého trčí hlavičky myosinu ven. Myosinová vlákna jsou schopna posunovat aktinová vlákna proti sobě, čímž se dosahuje místního zkracování svazků aktinových vláken.

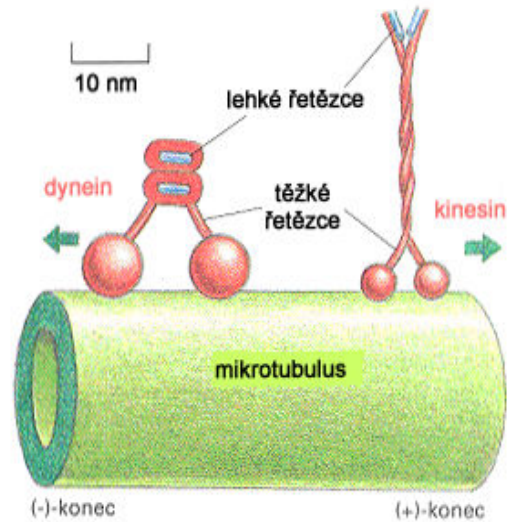


**Obr. č. 25** Některé funkce myosinu I a myosinu II

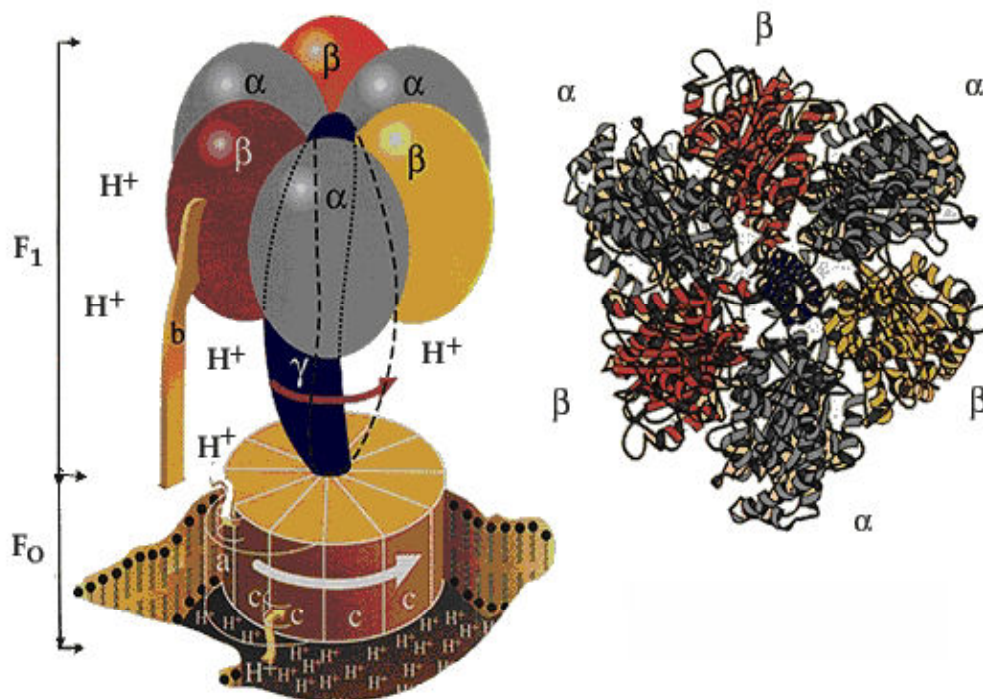
- **Kinesiny** jsou nejrozšířenější motory dopravující různý náklad uvnitř buněk podél mikrotubulí, a to na dlouhou vzdálenost (až několik mikrometrů). Jejich krok je cca 8 nm (**obr. č. 48**). Kinesiny sestávají ze dvou velkých globulárních hlaviček, které se připojují k mikrotubulím, centrálního svinutého řetězce a tzv. lehkého řetězce, který se připojuje k přepravovanému nákladu (např. vezikule). Většina kinesinů se pohybuje směrem k + konci mikrotubule (**obr. č. 26**).

<sup>57</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, str. 537, ISBN 80-902905-0-4

- **Dyneiny** jsou motory rovněž přenášející náklad podél mikrotubulí na dlouhou vzdálenost, ale k jejich minus konci, tj. ke středním oblastem buňky (**obr. č. 26**). Mají podobnou strukturu jako kinesin, ale jsou větší (mají molekulární hmotnost cca 1500 kDa). Dyneiny se dělí na cytoplazmické (přenášejí různé náklady v buňkách) a axonemální (též bičíkové dyneiny), které způsobují pokluzu mikrotubulí v axonech<sup>58</sup> řas či bičíků. Funkce dyneinu jsou stále předmětem výzkumu.



**Obr. č. 26** Mikrotubulární motory



**Obr. č. 27** Struktura  $F_1F_0$  ATP syntázy  
(Vlevo schéma, vpravo pohled na model části  $F_1$  zespondu)

<sup>58</sup> **Axonem** – svazek fibril vytvářejících střední jádro řas nebo bičíků

- **Prestin** je malý membránový protein (molekulová hmotnost cca 80 kDa) nacházející se ve vnějších vlasových buňkách vnitřního ucha živočichů a má význam pro schopnost slyšení. Je členem skupiny transportérů aniontů. Od ostatním motorů se odlišuje tím, že energii potřebnou pro svůj chod získává z rozdílu napětí na obou stranách membrány. Může se prodlužovat o cca 1 nm a jeho rychlost mnohonásobně převyšuje jiné typy motorů (pracuje v mikrosekundách). Motor byl identifikován v roce 2000 a bližší informace jsou dostupné např. v<sup>59</sup>.
- **F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP syntáza**, kterou nacházíme v membránách mitochondrií, je nejobvyklejší příklad molekulárního motoru přeměňujícího chemickou energii na mechanickou. Je schopna přeměnit membránový chemický gradient na rotační mechanický pohyb své gama podjednotky, což je spojeno se syntézou ATP podle rovnice  $ADP + P_{an} \rightarrow ATP + H_2O$  (ADP je adenosindifosfát a  $P_{an}$  je anorganický fosfát). Proces může probíhat i obráceně. V tomto případě je chemická energie použita pro generování mechanického pohybu nebo pro pumpování proteinů proti chemickému potenciálu. Enzym ATP syntáza má klíčovou roli v téměř všech organizmech žijících na Zemi, protože ATP je univerzální energetický zdroj energie. Např. v lidském těle se denně vytvoří přes 100 kg ATP, který následně slouží k poskytování energie při různých biochemických reakcích, včetně syntézy DNA a proteinů, kontrakce svalů, dopravu živin, nervové aktivity atd. V rostlinách a fotosyntetických bakteriích je enzym podstatný při konverzi solární energie a fixaci uhlíku. ATP syntáza je jeden z nejstarších enzymů na Zemi, který se objevil dříve než systém fotosyntézy a dýchání.

Struktura motoru je schematicky znázorněna na **obr. č. 27**. Motor sestává z hydrofobické podjednotky  $F_0$  spojené s membránou a hydrofilické podjednotky  $F_1$ , která z membrány vyčnívá do vodní fáze a zabezpečuje syntézu nebo hydrolýzu ATP.. Podjednotka  $F_0$  sestává ze tří různých proteinových molekul (části **a**, **b** a **c**). Protéká-li vodík membránou přes disk z **c** částí, je disk nucen se otáčet. Část  $\gamma$  podjednotky  $F_1$  je upevněna na disk, a proto se s ním otáčí. Části  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky  $F_1$  se však nemohou otáčet, protože jsou uzamknuty částí **b**, která je ukotvena k části **a** v membráně.  $\gamma$  část pracuje při otáčení jako excentrická osa, přičemž jsou  $\beta$  části nuceny zabezpečovat výše uvedenou chemickou reakci. Na spodní straně je motor řízen elektrochemickými gradienty, na vrchní straně je motor poháněn chemicky a je řízen hydrolýzou nebo syntézou nestabilní molekuly ATP. Celý komplex má molekulární hmotnost cca 500 kDa. Průměr podčásti  $F_1$  je cca 10 nm.

Buňky obsahují, mimo uvedené druhy, mnoho dalších molekulárních motorů, které zabezpečují různé funkce. Jsou to např. **helikázy**, které rozvíjejí dvojšroubovici DNA, aby se umožnila její replikace či transkripce, **DNA a RNA polymerázy**, které se pohybující se podél DNA a RNA při syntéze jejich rostoucích řetězců z nukleových kyselin, atd.

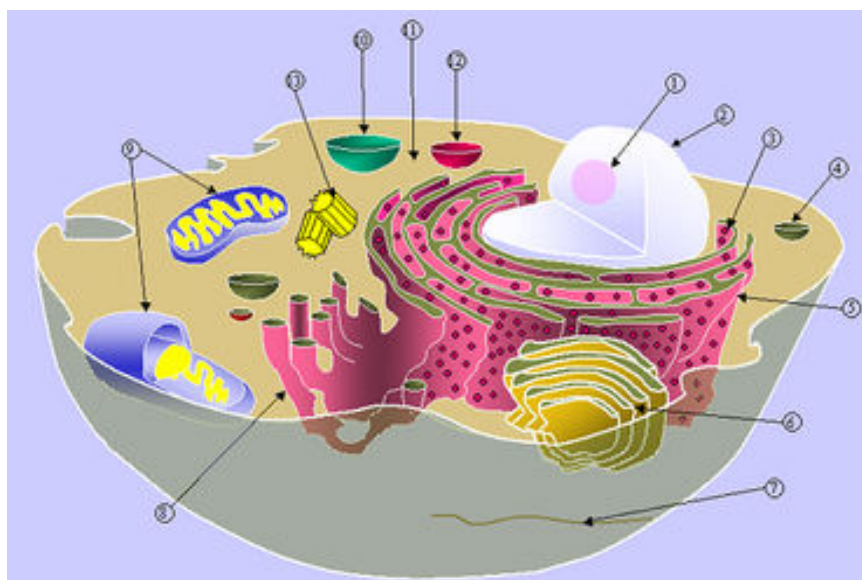
#### 4.3.8. MOLEKULÁRNÍ TOVÁRNA - BUŇKA

Rozlišujeme dva základní, různě vnitřně uspořádané a různě pokročilé typy buněk – prokaryontní a eukaryontní. Prokaryontní buňky dělíme zhruba na bakterie a archea, eukaryontní buňky na prvoky, rostliny, živočichy a houby. Pro snazší orientaci v dalším textu uvádíme vybrané základní informace o eukaryontní buňce.

<sup>59</sup> Zheng, J., W. Shen, D. Z. Z. He, K. B. Long, L. D. Madison, and P. Dallos: “Prestin is the Motor Protein of Cochlear Outer Hair Cells”, Nature, 405 (2000), str. 149-155.

Na **obr. č. 28**<sup>60</sup> jsou schematicky znázorněny nejdůležitější části eukaryotní (živočišné) buňky. Jak je z obrázku zřejmé, buňka obsahuje membránami ohraničené struktury – organely a další části, které jsou dále stručně charakterizovány:

- 1) **Jadérko**: struktura nacházející se v jádře. Její funkcí je tvorba r-RNA (ribozomální RNA) a účast na regulaci buněčného dělení.
- 2) **Jádro**: hlavní organela eukaryotní buňky. Obsahuje DNA, nositelku genetické informace, uspořádanou do chromozomů.
- 3) **Ribozom**: organela složená z RNA a proteinů. Je zodpovědný za syntézu proteinů. V buňce je jich velké množství.
- 4) **Transportní váčky** – vezikuly: membránové váčky přenášející proteiny z jednoho vnitrobuněčného oddílu do druhého (např. z endoplazmatického retikula (ER) do Golgiho aparátu).
- 5) **Drsné endoplazmatické retikulum**: část ER s přisedlými ribozomy. Jeho funkcí je syntéza proteinů. ER je složitá membránová struktura podobná bludišti.



**Obr. č. 28. Schéma živočišné buňky**

(1) jadérko (2) jádro (3) ribozom (4) membránový váček (také transportní váčky nebo vezikuly - součást membránového komplexu ER a GA), (5) drsné endoplazmatické retikulum (ER), (6) Golgiho agregát - GA, (7) cytoskelet, (8) hladké ER, (9) mitochondrie, (10) cytoplazma, (11) lyzozom, (12) centrozom

- 6) **Golgiho agregát**: membránová organela, ve které jsou modifikovány a tříděny proteiny a lipidy syntetizované v endoplazmatickém retikulu.
- 7) **Cytoskelet**: Cytoskelet je neustále se samoorganizující systém proteinových vláken v cytoplasmě eukaryotní buňky, který buňce zajišťuje polární tvar a schopnost řízeného pohybu. Nejhojnějšími složkami cytoskeletu jsou aktinová vlákna, mikrotubuly a intermediární filamenta.
- 8) **Hladké endoplazmatické retikulum**: část ER, bez přisedlých ribozomů, v němž probíhá syntéza lipidů a glykogenu, který se používá pro skladování energie v buňkách.

<sup>60</sup> <http://cs.wikipedia.org/organela>

- 9) Mitochondrie: membránová organela velikosti běžné bakterie, ve které probíhá oxidační fosforylace a produkce většiny ATP. Je to „elektrárna“ eukaryotní buňky. Fosforylace je účinný způsob získávání energie štěpením cukrů až na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Obsahuje mDNA.
- 10) Cytoplazma: vše, co obklopuje buněčná (plazmatická) membrána, kromě jádra
- 11) Lysozom: membránová organela obsahující trávicí enzymy. Vnitřek lysozomu je silně kyselý a jeho enzymy pracují při nízkém pH.
- 12) Centrozom: centrálně umístěná organela, která je prvotním centrem organizace mikrotubulů. Ve většině živočišných buněk obsahuje pár centriol.

Buňka je ohraničena plazmatickou membránou. Počet částí buňky je daleko větší, než ty uvedené na **obr. č. 28** a doposud je všechny neznáme. Všechny části jsou spojeny do dynamické sítě vzájemných složitých, neustále se měnících interakcí. Systém je organizačně uzavřen, ale současně otevřen, pokud se týká energetických, látkových a informačních toků. Systém je autonomní a sám se řídí.

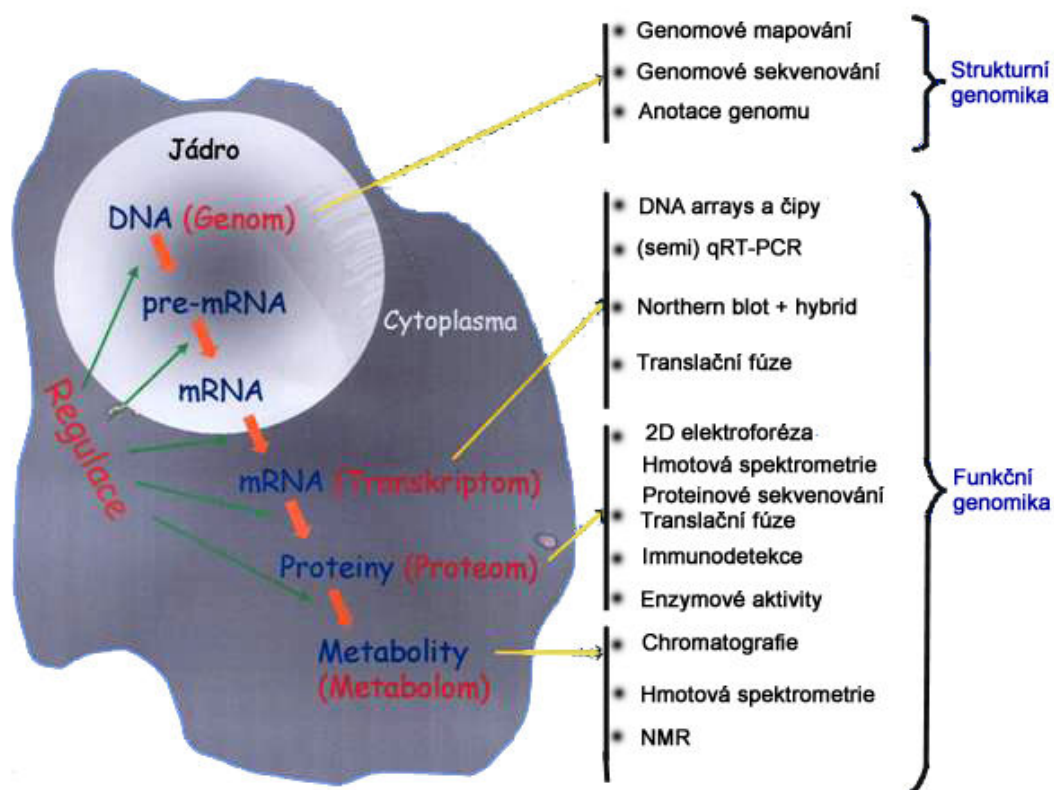
#### 4.3.8.1. Jádro

Jádra jsou hlavní organely eukaryotních buněk. Mají dvě hlavní funkce – řídit chemické reakce v cytoplazmě a uchovávat informace potřebné pro buněčné dělení. Jsou informační centra buněk. Mimo to, že jádra obsahují buněčný genom, obsahují i speciální regulační proteiny, které hrají významnou roli při regulaci genové exprese, která v jádru probíhá (určují které proteiny a kdy mají být vytvořeny). Jádro má rozměr 10 a více  $\mu\text{m}$ . Uvnitř jádra se nachází jadérko obklopené matrix, která se nazývá nukleoplazma. Je to tekutina s gelovou konzistencí, ve které jsou rozpuštěny různé látky jako nukleotridifosfát, enzymy, proteiny a transkripční faktory. V jádru se nachází genetický materiál (DNA) ve formě DNA – proteinového komplexu zvaného chromatin. DNA se nachází v chromozomech, kterých je u lidí 46. Známe dva druhy chromatinu – euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je nejméně kompaktní forma DNA a oblasti DNA, které tvoří euchromatin, obsahují geny, které se často účastní genové exprese. V heterochromatinu je DNA silně stlačena. Oblasti DNA, které tvoří heterochromatin obsahují geny, jež se neúčastní genové exprese a jsou to současně oblasti, které vytvářejí telomery a centromery chromozomů. Jádra jsou obklopena dvojrůstvou membránou – jadernou obálkou. Vnitřní a vnější membrány se v pravidelných intervalech spojují a vytvářejí jaderné póry. Jaderná obálka reguluje a umožňuje transport mezi jádrem a cytoplazmou. Vnější membrána navazuje na drsné endoplazmatické retikulum a může obsahovat ribozomy.

#### 4.3.8.2. Syntéza proteinů

Buňky jsou schopné syntetizovat nové proteiny, které jsou nezbytné pro modulaci a údržbu její činnosti. Proteosyntéza, jak se tento proces nazývá, byla popsána v části 4.2.2. Jeto rovněž proces postupu genetické informace buňkou. Cesta genetické informace z jádra buňky probíhající prostřednictvím základních biologických částic (DNA, mRNA, proteinů) a vědní oblasti, které se věnují jejímu zkoumání, jsou znázorněny na **obr. č. 29**. Příslušné definice názvů jsou uvedeny v **Tab. č. IV**. Na obrázku jsou uvedeny i vybrané zkušební metody a postupy v jednotlivých vědních podoblastí. Na **obr. č. 29** je schematicky znázorněn postup genetické informace od genů nacházejících se v jádru v chromozomech (oblast strukturní genomiky), přes mRNA (oblast transkriptomiky), proteiny (oblast proteomiky) k metabolitům (oblast matabolomiky). Posledně tři uvedené oblasti patří k funkční genomice. Na obrázku jsou uvedeny i hlavní metody používané při zkoumání procesů v jednotlivých oblastech.

Výsledky výzkumů v uvedených oblastech přinesly již převratné změny v názorech na vznik chorob a způsobů jejich léčení (viz 5.4.1.).



Obr. č. 29 Schéma toku informací v buňce

Tab. č. IV.

**GEN** – je úsek DNA se specifickou funkcí. Je to kódující oblast v segmentu eukaryontní DNA. Geny jsou jednotky dědičnosti v živých organizmech.



Obrázek znázorňuje gen ve vztahu k dvojitřroubovicové struktuře DNA a k chromozomu (vpravo). Introny jsou oblasti často se vyskytující v eukaryontních genech, které jsou v průběhu genové exprese odřezávány. Pouze exony kódují protein. Obrázek zachycuje gen o rozsahu asi 40 bazí. Ve skutečnosti je mnoho genů větších.

**GENOM** je soubor genetických informací uložených v DNA (u některých virů v RNA) konkrétního organismu.



DNA (u některých virů v RNA) konkrétního organismu. Zahrnuje všechny geny a nekódující sekvence.

**GENOMIKA** – věda, která studuje geny a jejich funkce. Je to i technologie, která vytváří mapu všech genetických informací lidí, zvířat rostlin a mikroorganismů,

**Strukturní genomika** – zabývá se stanovením struktur proteinů v trojrozměrném prostoru vysoce produktivními metodami.

**Funkční genomika** – si klade za cíl objevit biologické funkce jednotlivých genů a zjistit jakým způsobem skupiny genů a jejich produktů spolupůsobí ve zdravém i nemocném organismu

**Komparativní genomika** – porovnává genomy různých organismů; zjišťuje genetickou podobnost nebo odlišnost organismů.

**TRANSKRIPTOM** – je soustava molekul mRNA (transkriptů) jedné nebo populace biologických buněk v daných podmínkách prostředí. Transkriptom podléhá změnám při analýze.

**TRANSKRIPTOMIKA** – popisuje úroveň genů po expresi (úroveň genů v mRNA po expresi není přímo úměrná úrovni genů v proteinu).

**PROTEOM** – je soubor všech proteinů a jejich stavů v daném organismu nebo systému (buněčný proteom, virální proteom, úplný proteom organismu).

**PROTEOMIKA** - je součástí genomiky a zabývá se studiem proteinů, zejména jejich strukturou a funkcemi v těle a stanovení jejich úlohy v životních pochodech organismů. Je to studium proteomů.

**Strukturní proteomika** – viz Strukturní genomika

**Funkční (interakční) proteomika** – zabývá se interakcemi proteinů na atomové, molekulární a buněčné úrovni s jinými proteiny a dalšími biopolymery.

**Buněčná proteomika** – jejím cílem je zmapovat rozmístění proteinů a jejich interakce v buňkách v průběhu klíčových buněčných událostí (poměrně nová oblast proteomiky).

**METABOLOM** – Metabolom reprezentuje kolekci všech metabolitů v biologickém organismu, které jsou konečnými produkty po genové expresi. **Metabolity** jsou koncové produkty nebo meziprodukty zůstávající po metabolismu (např. malé molekuly, kyslík, kyselina močová, glukóza, antibiotika, pigmenty – nyní více než 1400 látek).

**METABOLOMIKA** – může být definována jako kvantitativní měření všech metabolitů s malou molekulární hmotností v buňkách organismů za specifický čas a za specifických podmínek prostředí.

Očekává se, že studium kombinace informací plynoucích z metabolomiky, proteomiky, transkriptomiky a genomiky může přispět k celkovému porozumění biologii buňky.

#### **4.3.9. APLIKACE BIOMOLEKUL A BIOSYSTÉMŮ V NANOTECHNOLOGIÍCH - BIONANOTECHNOLOGIE**

Napodobování biologických koncepcí a principů (biomimetika) je velkou hnací silou pro rozvoj výzkumu v nanotechnologiích, v oblasti nazývané bionanotechnologie. Výzkum a vývoj v této oblasti dosáhl již obrovských rozměrů.

Přírodní proteiny, včetně enzymů, se používají při výrobě potravin a nápojů po tisíciletí a v některých průmyslových procesech po staletí, aniž bylo cokoli známo o jejich podstatě. Struktura a funkce známých biomateriálů, jako jsou dřevo, kosti a mušle, poskytují podklady pro vytváření nových materiálů v nanorozměrech, které mají specifické vlastnosti. Biologické metody ukládání a vyhledávání informací jsou nyní využívány pro řešení výpočetních problémů a usvědčování zločinců. Biologie poskytuje mnoho základních stavebních kamenů

a metod pro návrhy funkčních nanosystémů. Ukázalo se, že definici nanotechnologie odpovídá i několik, již delší dobu používaných biologických a biotechnologických postupů, jako je např. proteinové inženýrství a využití vlastností DNA.

Implementace „měkkých a mokrých“ biologických komponent do v současné době používaných nanotechnologických systémů však přináší výhody i problémy, zejména při konstrukci a výrobě „tvrdých a suchých“ polovodičů a dielektrik. Biomolekuly mají totiž některé zvláštní vlastnosti<sup>61</sup>:

- Celá řada biomolekul, včetně nuklových kyselin, proteinů, lipidů a oligosacharidů, reaguje s jinými biologickými komponentami či rozhraním pomocí biologického rozpoznávání, které je důležité při nanovýrobě, způsobem „bottom-up“, založeném na samosestavování.
- Enzymy mohou katalyzovat syntézu a rozklad jak biologických, tak syntetických molekul.
- Biomolekulární reakce jsou vysoce selektivní a závislé na místě, kde se reakce uskutečňuje.
- Biomolekulární reakce, probíhající za fyziologických podmínek, mají často velkou účinnost, což vede, ve srovnání s chemickou syntézou, k mnohem lepším výsledkům.
- Použití biomolekul a bioprocusů je většinou příznivé pro životní prostředí. Zpracování odpadů reakcí může být minimalizováno a vedlejší produkty nejsou velkým rizikem, např. ve srovnání s výrobou polovodičů.

Použití biomolekul při bionanovýrobě však může mít za následek určitá omezení:

- Při současných způsobech přípravy nanostruktur a nanosystémů se často používá velmi vysokého vakua, což může ve většině případů zničit strukturní integritu biomolekul.
- I ve vodním prostředí mohou např. při depozici snadno ztratit proteiny své přirozené aktivní konformace, protože se mohou rozbalit a specificky se vázat na povrch.
- Biologické reakce (s některými výjimkami) se musí uskutečnit ve vodním prostředí nebo v tlumicím roztoku, což omezuje jejich použití v mnoha elektronických aplikacích.

Uvedené problémy jsou významné, ale nikoliv nepřekonatelné. O tom svědčí řada příkladů, z nichž některé dále uvádíme.

#### 4.3.9.1. Proteinové inženýrství

V osmdesátých letech 20. století začalo postupně vznikat a stále se rozvíjí **proteinové (a též enzymové) inženýrství**<sup>62</sup>. Proteinové inženýrství může být definováno jako použití genetických a chemických technik pro změnu struktury a funkcí proteinů. Cílem bývá změna funkce, rozpustnosti, odporu proti degradaci, schopnosti krystalizovat, terapeutického potenciálu aj. Byla vyvinuta řada metod pro modifikaci proteinů, z nichž nejdůležitější jsou cílená mutagenese, chemická modifikace, syntéza za použití proteázy, totální syntéza, štěpení páteře struktury, „použití neobvyklých aminokyselin aj. Charakteristika řady metod je

<sup>61</sup> Chow et al „Nanofabrication with Biomolecules“, Nanotoday, Dec. 2005, str. 30.

<sup>62</sup> Kodíček M.: „Biochemické pojmy – výkladový slovník“, vyd. VŠCHT, Praha, 2004, ISBN 80-7080-551-X, str. 88.

dostupná na<sup>63</sup>. Provádění různých postupů proteinového inženýrství nabízí dnes řada specializovaných firem.

Cílená mutagenese byla poprvé popsána v roce 1978. Je to technika, kdy mutace proteinu je vytvořena na definovaném místě jeho molekuly DNA, obvykle na kruhové molekule zvané plasmid.<sup>64</sup> Mutovaný plasmid je přeměněn ve vybraném produkčním organismu (většinou v bakterii *E.coli*). Do hostitelské buňky, která má být výrobcem modifikovaného proteinu, je tedy vnášen gen, který je synteticky upraven či kombinován z přírodních a syntetických úseků, takže není identický s původním genem. Jako příklad použití cílené mutagenese může sloužit práce D.Bakera et al<sup>65</sup>, kteří vyzkoušeli, zda je možné omezit počet aminokyselin v proteinu a použít k dalším pokusům jen jeho základní jádro. Postupně zaměňovali každou aminokyselinu v proteinu jinými aminokyselinami (isoleucinem, glutaminem, alaninem, lysinem a glycinem). Po vyzkoušení řady záměn našli zjednodušenou formu proteinu, který se skládal do stabilní struktury a zachoval si většinu svých funkcí. V tomto proteinu bylo zaměněno 40 ze 45 aminokyselin. Proteinové inženýrství je možné pokládat za jednu z rozvinutých oblastí bionanotechnologie<sup>66</sup>.

#### 4.3.9.2. DNA nanotechnologie

Systematický průzkum vlastností DNA ukázal, že molekula může být použita pro zcela jiný účel než má v přírodě. Motivace pro její použití v nebiologických aplikacích spočívá především ve výhodné kombinaci jejích vlastností: schopnosti samosestavování, v poměrně dobré chemické a fyzikální stabilitě, ve velké schopnosti rozlišovat (rozpoznávat), v dobré selektivitě a v polyanionickém charakteru. Nukleové kyseliny lze stříhat, sestavovat, rozdělovat, spojovat, kopírovat a vyrábět duplikáty. Dále, nukleové kyseliny mohou být připraveny s přesností na úrovni desetin nm enzymy jako jsou nukleázy a polymerázy. Bylo zkoumáno využití DNA v řadě oblastí, např. v technologii biočipů, jako konstrukční materiál, při vytváření periodicky uspořádaných nanostruktur, při vytváření nanodrátků, pro využití v mikroelektronice, pro využití v počítačích, v senzorech atd.<sup>48,67,68</sup> Uvádíme několik příkladů.

##### 4.3.9.2.1. Nanostrukturní materiály

Molekuly DNA mohou být snadno spojovány a sestavovány do nanostrukturních materiálů třemi strategiemi<sup>69</sup>:

- Elektrostatickými interakcemi s polyfosfátovou páteří
- Kovalentní funkcionalizací buď na 3' nebo 5' konci oligonukleotidového vlákna
- Kovalentním nebo elektrostatickým připojením k anorganické částici

N.C. Seeman a spolupracovníci z New York University se samosestavováním DNA vláken DNA do větších struktur začali zabývat začátkem osmdesátých let minulého století.

---

<sup>63</sup> [www.protocol-online.org](http://www.protocol-online.org)

<sup>64</sup> **Plasmid** – kruhová molekula dvojitřoubovicové DNA, která je oddělena od chromozomové DNA. Vyskytuje se v bakteriích, zřídka v eukaryontních organizmech.

<sup>65</sup> Baker D. et al. „Functional Rapidly Folding Protein from Simplified Amino Acids Sequences“, *Nature Structured Biology*, 4, 1997, 805.

<sup>66</sup> Ratner M, Ratner D.: „Nanotechnology – a Gentle Introduction to the Next Big Idea“, Prentice Hall, 2002, ISBN 0-13-101400-5, str. 117.

<sup>67</sup> Csáki A et al „DNA Based Molecular Nanotechnology“, *Single Mol.*, 3, 2002, str. 275.

<sup>68</sup> Bashir R. „DNA Nanobiostuctures“, *Materialstoday*, Nov/Dec 2001, str. 30

<sup>69</sup> Dujardin E., Mann S.: „Bio-inspired Materials Chemistry“, *Adv.Eng.Mat.*, 4, 2002, str 461

Prokázali, že molekula DNA je ideálním konstrukčním materiálem v nanoměřítku. Vytvořili rozvětvené molekuly se čtyřmi rameny, které lze dále spojovat do větších dvou i trojrozměrných periodicky uspořádaných celků. Postupně vytvořili spoje s pěti a šesti rameny, poté čtverci, krychle obsahující 480 nukleotidů a zkosený osmistěn obsahující 2550 nukleotidů molekulární hmotnosti cca 790 kD. Krychle syntetizovali v roztoku. Později přešli ke způsobu založeném na pevné podložce, což velmi zlepšilo kontrolu procesu a dovolilo hromadné paralelní samosestavování. Seemanovy DNA řetězce sestavené do rámců (kachliček) byly natolik pevné, že mohly sloužit jako nosníky molekulární kostry, ale spoje byly příliš poddajné. V roce 1993 byl objeven pevnější motiv antiparalelní DNA s dvojným křížením (DX molekula), který byl později použit pro konstrukci spojů odolných proti průhybu.

Dalším cílem (1998) bylo sestavení velkých uspořádaných souborů DNA krystalů ve tvaru klecí při použití DX molekuly<sup>70</sup> a později byla vytvořena ještě pevnější molekula TX s trojitým křížením<sup>71</sup> - **obr. č. 30**. Na levé straně obrázku nahoře jsou znázorněny čtyři složky struktury. A, B, C jsou TX molekuly a D je konvenční dvojšroubovicová molekula. A a B mohou být spojeny horní a spodní částí k kachličce v rovině, což je ukázáno pod složkami. Toto uspořádání má mezery, které mohou být zaplněny jednou dvojšroubovicí DNA.

Snímek z AFM ukazuje zřetelně vytvořený objekt. Práce Seemanovy skupiny byly souhrnně popsány např. v<sup>72</sup>. Výsledky činnosti laboratoře N.C. Semana se staly předmětem několika patentů a jsou nyní komercializovány společností Nanoscience Technologies, Inc.<sup>73</sup> Dalším cílem je vytváření trojrozměrných struktur, začleňování nanozařízení do DNA struktur a v daleké budoucnosti syntéza makro objektů.

Samosestavováním byly vytvořeny motivy, které mohou sloužit jako kostra pro sestavování jiných molekulárních komponent, např. pravidelných uspořádaných souborů peptidů a proteinů, např.<sup>74,75</sup>. Yan H et al sestavili DNA nanostrukturu sestávající ze čtyř čtyřramenných spojů s kavitací ve tvaru čtverců<sup>76</sup> - **obr. č. 31**.

---

<sup>70</sup> Winfree et al „Design and Self-assembly of Two-dimensional DNA Crystals“, Nature, 394, 1998, str. 539.

<sup>71</sup> T.H. LaBean et al “The Construction, Analysis, Ligation and Self-assembly of DNA Triple Crossover Complexes,” J. Am. Chem. Soc. 122, 2000, str.1848

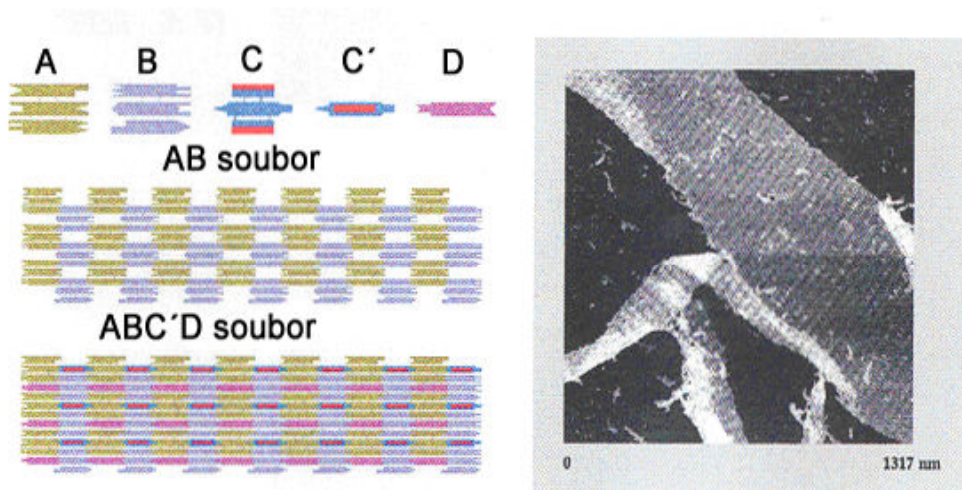
<sup>72</sup> Seeman N.C. „Nanotechnologie a DNA“, Scientific American, české vydání, červen 2005, str. 40.

<sup>73</sup> www.nanoscience-tech.com

<sup>74</sup> Niemeyer C.M. et al “Oligonucleotide-directed Self-assembly of Proteins: Semisynthetic DNA – Streptavidin Hybrid Molecules as Connectors for the Generation of Macroscopic Arrays and the Construction of Supramolecular Bioconjugates,” Nucleic Acids Res., 22, 1994, str.5530.

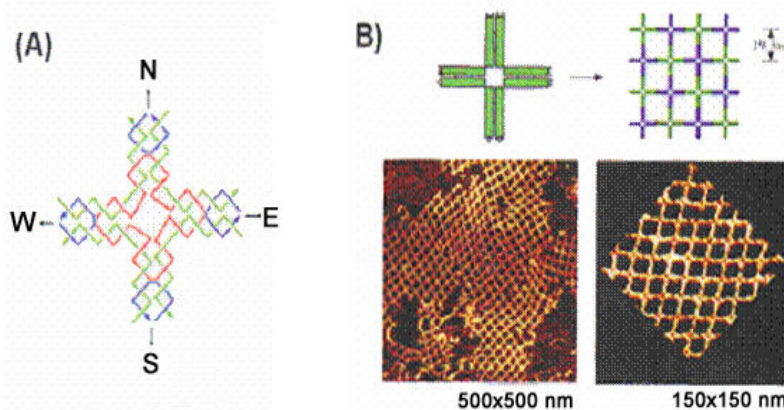
<sup>75</sup> Smith s.s. et al “Nucleoprotein-based Nanoscale Assembly,” Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 1997, str. 2162.

<sup>76</sup> Yan et al „DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires“, Science, 301, 2003, str. 1882



**Obr. č. 30** Dvojměrné krystalické uspořádání TX molekul

Periodický proteinový soubor byl získán samosestavováním proteinu streptavidin na templátu nanomřížky DNA, která obsahovala oligonukleidy. Stejná mřížka byla použita pro vytvoření stříbrných nanodrátků (pásky o rozměrech 25 x 43 nm o délce až 5 μm).



**Obr. č. 31** Samosestavování DNA molekul v nanorozměrech (upraveno podle <sup>61 a 69</sup>)

- DNA řetězce sestávající z 9 vláken, z nichž jedno (červené) je společné všem čtyřem spojům
- Řetězce se spojují do nanomřížky

D. Liu et al. vytvořili a charakterizovali DNA nanotrubičky samosestavované z TX molekul (s trojitým křížením). DNA nanotrubičky měly průměr cca 25 nm a byly pozorovány délky až 20 μm. Nanotrubičky byly úspěšně metalizovány stříbrem<sup>77</sup>.

#### 4.3.9.2.2. Připojení DNA k povrchu zlata

Nejpoužívanějším způsobem připojení DNA k povrchu je kovalentní vazba mezi sírou a zlatem. Velmi silná vazba vznikne použitím kovového thiolátu, který vytváří stabilní film vhodný pro připojení funkčních skupin. DNA může být funkcionalizována thiolovou S-H skupinou na 3' nebo 5' koncích. Ponořením čistého zlatého povrchu do roztoku oligonukleotidů s thiolem je síra absorbována na zlatém povrchu a vytvoří se monovrstva

<sup>77</sup> D. Liu et al. „DNA Nanotubes Self-assembled from Triple-crossover Tiles as templates for Conductive Nanowires“, PNAS, 101, 2004, str. 717.

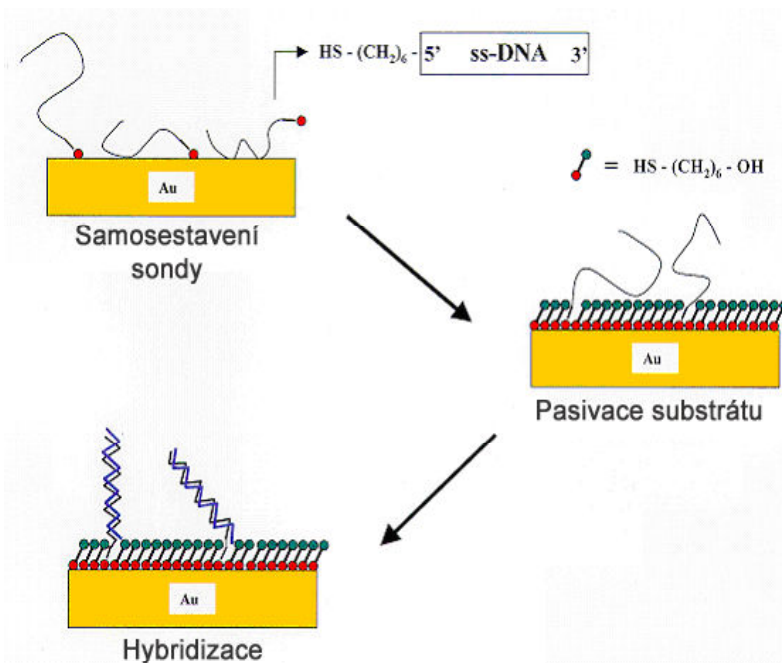
molekul, kde jsou uhlovodíky nahrazeny jedno- nebo dvojšrobvicovou DNA. Vysoká afinita thiolové skupiny ke zlatu má za následek stabilní spojení. Chemie založená na thiolech je základní připojovací schéma DNA a oligonukleotidů při samosestavování umělých nanostruktur. Na **obr. č. 32** je schematicky znázorněn jeden ze způsobů vytváření monovrstvy DNA na zlatém povrchu. Monovrstva se vytváří dvoustupňovým procesem.

V prvním stupni se kousek čistého nepokrytého zlata ponoří do roztoku s thiolovanou jednořetězcovou DNA (HS-ssDNA) a vytvoří se tzv. sonda. Povrch s nanosenou HS-ssDNA se potom ponoří do roztoku další thiolové molekuly – merkaptohexanolu (MCH). MCH nejen, že pasivuje povrch a zabraňuje nespécifické adsorpci DNA z roztoku, ale též vymísťuje nespécificky adsorbovanou HS-ssDNA (ty molekuly, jež interagují s povrchem jinými způsoby než prostřednictvím thiolové skupiny).

Hybridizace (spárování jednotlivých řetězců DNA za tvorby dvojšrobvicové DNA) se provádí expozicí povrchu imobilizovanými molekulami DNA (zkoušený materiál) v roztoku, který obsahuje jednořetězcovou DNA s komplementární sekvencí (target).

Uvedený způsob byl použit např. v práci<sup>78</sup>.

Metoda je důležitá např. při vytváření biosenzorů a v mnoha dalších aplikacích (biočipy, bioelektronické přepínače a brány, chemická separace a purifikace povrchů).



**Obr. č. 32** Vytváření DNA monovrstev na zlatu prostřednictvím thiolové vazby

#### 4.3.9.2.3. Samosestavování nanostruktur pomocí DNA

Samosestavování nanočástic pomocí DNA se dostalo velké pozornosti. První, kdo provedli samosestavení zlatých nanoklastrů do periodicky uspořádaných struktur za použití DNA byli C.A. Mirkin a A.P. Alivisatos se spolupracovníky<sup>79,80</sup>. Za pomocí DNA templátů byly

<sup>78</sup> Csáki A et al „DNA Monolayer on Gold Substrates Characterized by Nanoparticle Labeling and Scanning Force Microscope“, Nucleic Acid Research, 29, 2001, No.16.

<sup>79</sup> Mirkin C.A. et al „A DNA-based Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials“, Nature, 382, 1996, str. 607.

<sup>80</sup> Alivisatos A.P. et al „Organization of „Nanocrystal Molecules“ Using DNA“, Nature, 382, 1996, str. 609

syntetizovány zlaté drátky<sup>81</sup>, zlaté tyče<sup>82</sup>, stříbrné drátky<sup>83</sup>, Au-Pt koloidní tyčinky<sup>84</sup>, DNA byla dekorována fullereny<sup>85</sup> atd.

#### 4.3.9.2.4. Mechanochemická zařízení a motory

DNA byla využita při konstrukci a vytváření různých nanostrojů, motorů a aktivních zařízení.

- V laboratoři N.J.Seemana byl zkonstruován nanomechanický přepínač, jehož konformace je měněna změnou chiralitu dvojšroubovice DNA<sup>86</sup>. Systém sestával ze dvou tuhých molekul typu DX spojených spojovacím členem – dvojšroubovicí DNA, která přísadou  $(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  měnila svoji konformaci z B na Z.
- B. Yurke et al z Bellových laboratoří a A. Turberfield z Oxford Univerzity zkonstruovali DNA nanostroj, sekvenčně závislý aktuátor, ve kterém se DNA používá nejen jako konstrukční materiál, ale současně jako palivo pro pohon stroje<sup>87</sup>. Stroj vytvořený ze tří řetězců DNA má tvar dvojice pinzet, které jsou uzavírány a otevírány přidávkem vnějšího řetězce „palivové“ DNA. Činnost stroje je řízena „palivovým“ řetězcem DNA s velkou přesností. Stroj po vložení „palivového“ řetězce pracoval nepřetržitě po 7 cyklů a nanopinzety se uzavíraly a otevíraly v rozmezí 1 – 7 nm rychlostí cca 13 cyklů/sec. Stroj byl sestaven a pracuje ve vodním prostředí.
- J.J. Li a W. Tan z University of Florida sestrojili nanomotor z jedné molekuly DNA. Nanomotor může nabývat dvě zřetelné konformace – intramolekulární tetraplex a intermolekulární duplex. Nanomotor přepíná mezi těmito konformacemi měněním hybridizace DNA a výměnnými reakcemi v řetězci. To umožňuje nanomotoru provádět pohyb charakteru roztažení – smrštění jako u pídalky. Činnost nanomotoru byly pozorována v reálném čase po označení fluoroforem. DNA nanomotor pracoval jak v roztoku, tak i na povrchu. Jeho stabilní struktura, spolehlivá činnost a vysoká účinnost jej předurčuje pro budoucí pohonné jednotky nanosystémů<sup>88</sup>.

#### 4.3.9.2.5. DNA a mikro/nanoelektronika

Pokrok elektronického průmyslu v posledních desetiletích byl založen na výrobě stále menších zařízení a integrovaných obvodech s rostoucí hustotou komponent, což vedlo mj. k výrobě stále výkonnějších počítačů. Tento rychlý růst je však omezen možnostmi stávající výrobní technologie (litografie), velkým rozptylem tepla při práci obvodů a kapacitními vazbami mezi sousedícími komponenty. Navíc, zmenšováním jednotlivých zařízení do oblasti nanorozměrů koliduje se základními fyzikálními zákony. V konvenčních elektronických zařízeních založených na křemíku je informace přenášena pohyblivými elektrony uvnitř pásu dovolených energií, v závislosti na pásové struktuře polovodiče.

Zmenšují-li se rozměry do oblasti nanometrů, pak pásy se změny do diskretních energiových úrovní a kvantové jevy indukují lokalizaci. Pro další rozvoj miniaturizace integrovaných obvodů se tedy hledají nové technologie, které plně využijí výhod kvantově mechanických

---

<sup>81</sup> Mbindyo J.K.N. et al “DNA-directed Assembly of Gold Nanowires on Complementary Surfaces,” *Advanced Materials*, 13, 2001, str. 249.

<sup>82</sup> Dujardin E. et al “DNA-driven Self-assembly of Gold Nanorods,” *Chem. Commun.*, 2001, str. 1264.

<sup>83</sup> Braun E. et al “DNA-templated Assembly and Electrode Attachment of a Conducting Silver Wire,” *Nature*, 391, 1998, str. 775.

<sup>84</sup> Martin B.R. “Orthogonal Self-assembly on Colloidal Au-Pt Nanorods,” *Adv. Mater.*, 11, 1999, str. 1021.

<sup>85</sup> Cassel A.M. et al “Assembly of DNA/fullerene Hybrid Materials,” *Angew. Chem. Int.*, 37, 1998, str. 1528

<sup>86</sup> Mao C. et al „A Nanomechanical Device Based on the B – Z Transition of DNA“, *Nature*, 397, 1999, str. 144.

<sup>87</sup> Yurke B. et al. „A DNA-fuelled Molecular Machine Made of DNA“, *Nature*, 406, 2000, str. 605.

<sup>88</sup> Li. J.J., Tan W. „A Single DNA Molecule Nanomotor“, *Nano Letters*, 2, 2002, str. 315.

jevů. Jednou z možných cest je vytváření zařízení využívajících molekul (molekulární elektronika). Základní ideou molekulární elektroniky je použití jednotlivých molekul jako drátů (spojů), spínačů, usměřovačů a pamětí.

Jinou koncepcí molekulární elektroniky je změna ve způsobu výroby součástek, a to ze způsobu top-down (litografie) ke způsobu bottom-up, při kterém jsou součástky i celé systémy vytvářeny z malých základních stavebních kamenů (složek), s využitím jejich schopnosti se vzájemně rozpoznávat, strukturovat se a samosestavovat se. V současné době se intenzivně zkoumají různí kandidáti pro využití v molekulárních zařízeních, jako např. malé organické polymery, velké biomolekuly (DNA, aj.), nanotrubičky a fullereny.

Jedním z významných kandidátů pro použití v molekulární elektronice (nanoelektronice) je pro svoje unikátní vlastnosti DNA. Zkoumají se především její elektrické vlastnosti, zejména vodivost, tj. schopnost přenosu náboje. Jak se ukazuje, do určité míry jsou vodivé jen velmi krátké sekvence molekuly DNA a delší sekvence (o délce nad cca 40 nm) jsou nevodivé<sup>89</sup>.

Tento problém se řeší metalizací vláken DNA nebo jejich dopováním kovovými ionty, O<sub>2</sub> atd. Problémem je připojování vláken DNA k elektrodám, charakterizace nanozařízení, měření vlastností v nanorozměrech atd. Nicméně, výzkum a vývoj využití DNA v molekulární elektronice se intenzivně rozvíjí a má velkou perspektivu, nehledě na to, že praktická realizace jeho výsledků se očekává v horizontu 10-15 let.

Uvedeme některé příklady z oblasti využití DNA v nano/mikroelektronice.

#### 4.3.9.2.6. Integrace DNA molekul do mezery mezi elektrodami

Schopnost přesně umísťovat biomolekuly na mikrostrukturované substráty je klíčová technologie dlouhodobého cíle molekulární bionanotechnologie – integrovat biomolekulární jednotky v technických zařízeních. Pro uskutečnění tohoto cíle jsou nezbytné postupné kroky, jako např. výzkum elektrické vodivosti DNA, vývoj technologií metalizace roztažené a imobilizované DNA, vývoj manipulačních technologií (např. gelová elektroforéza, nanolitografie), vývoj potenciálních paralelních výrobních procesů atd. Důležitým problémem při řešení těchto úkolů je optimální způsob integrace DNA a dalších biomolekul do mezery mezi elektrodami. Mezery mají obvykle šířku v mikrometrech (2 -15 μm). DNA o větších délkách má špatnou elektrickou vodivost, a proto je třeba vlákno metalizovat, což je obtížné.

- Jeden ze způsobů integrace nanodrátků do mezery mezi elektrodami využívá mezeru o rozměru mikrometrů, která je náhodně pokrývána molekulárními strukturami. V tomto případě identifikace přemosťujících struktur vyžaduje speciální prostředky (obvykle ultramikroskopy). Reprodukovatelný paralelní projev jednotlivých molekul je problematický. Jedním z prvních příkladů je práce E. Brauna et al<sup>90</sup>, kteří spojili mikro elektrody s mezerou o šířce 12-16 μm vláknem DNA a postupně je částečně postříbili. Dalším příkladem je práce A. Rakitina et al<sup>91</sup>. Autoři porovnávali vodivost svazku molekul lambda-DNA s vodivostí svazku M-DNA. Měření bylo provedeno v mezeře o šířce 10 μm ve vakuu. Zjistili dobrou vodivost v M-DNA, ve srovnání s lambda-DNA, která se chovala při pokojové teplotě jako polovodič.
- Jiným způsobem je vytvoření elektrického spojení až potom, co jsou molekuly nahodile imobilizovány a modifikovány, a to buď trvalým zapojením pomocí elektronové litografie, nebo spojením na přechodnou dobu použitím elektrod

<sup>89</sup> Porath D. et al „Charge Transport in DNA-based Devices“, Topics in Current Chemistry, 237, 2004, str. 189.

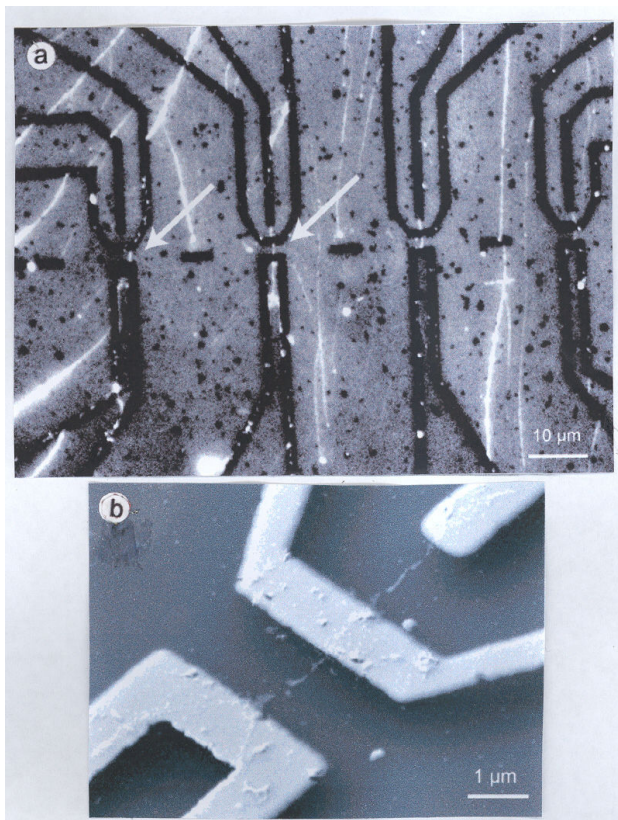
<sup>90</sup> Braun E. et al „DNA-templated Assembly and Electrode Attachment of Conducting Silver Wire“, Nature, 391, 1998

<sup>91</sup> Rakitin A. et al „Metallic Conduction through Engineered DNA: DNA Nanoelectronic Building Blocks“, Phys.Rev.Lett., 86, 2001, str. 3670.



založených na skenující sondě (AFM), ve spojení s částečně metalizovaným substrátem. Prvý způsob použili např. K.Keren et al.<sup>92</sup>. Druhý způsob použili např. L.Cai et al.<sup>93</sup>.

- Možnosti paralelní přípravy spojení elektrod molekulami DNA popsali nedávno G.Maubach a W.Fritsche z IPTH Jena al.<sup>94</sup>. Na základě výsledků svých předcházejících prací vytvořili nejprve na substrátu SiO<sub>2</sub> fotalitograficky strukturu sestávající ze čtyř paralelních elektronických obvodů s elektrodami ze zlata – **obr. č. 33a**. Poté do mezer umístili mikropipetou imobilizovaná vlákna DNA v roztoku, fluorescenčně označená pro pozorování v skenovacím silovém mikroskopu. Podařilo se umístit vždy jedno vlákno DNA v jedné mezeře. Následovala metalizace celých vláken DNA (nejen jejich částí) nanosením roztoku s nanočásticemi zlata o průměru 20 nm do mezery mezi elektrodami s umístěnou DNA. Nanočástice se elektrostatickou adsorpcí uchytily úspěšně na vláknech DNA – **obr. č. 33b**. Měření elektrické vodivosti prokázalo lineární závislost volt-ampérové charakteristiky. Uvedené práce mohou sloužit jako příklad počátečních prací při vývoji zařízení pro nanoelektroniku.



**Obr. č. 33** Paralelní umístění metalizované DNA mezi elektrodami (upraveno podle<sup>94a</sup>)

<sup>92</sup> Keren K. et al „Sequence-Specific Molecular Litography on Single DNA Molecules“, Science, 297, 2002, str. 72.

<sup>93</sup> Cai L. et al „Self-assembled DNA Network and their Electrical Conductivity“, Appl. Phys. Lett., 77, 2000, str. 3105

<sup>94</sup> a) Maubach G., Fritsche W. „Precise Positioning of Individual DNA Structures on Electrode Gaps by Self-organization onto Guiding Microstructures“, Nano Lett., 4, 2004, str. 607.

b) Maubach G., Born D., Csáki Andrea, Fritsche W. „Parallel Fabrication of DNA-aligned Metal Nanostructures in Microelectrode Gaps by a Self-organization Process“, Small, 1, 2005, str. 619.

#### 4.3.9.2.7. DNA tranzistory

Hledání menších a rychlejších logických zařízení přetrvává již od dob objevu klasického tranzistoru (1948). Teprve A.Aviram a M.A.Ratner předložili v roce 1974 ideu použít jako komponenty elektronického obvodu jednu organickou molekulu<sup>95</sup>. Problémy spojené s připojením jedné molekuly k vnějším vodičům posunuly ověření této představy až na konec devadesátých let dvacátého století. Na základě v té době již získaných zkušeností (schopnost povlékat DNA kovy), předložili E. Ben-Jacob et al představu o vytvoření DNA tranzistoru (jednoelektronového tunelového tranzistoru)<sup>96</sup>.

V roce 2001 sestavili M.W. Wu a paní L.L. Sohn jednoduchý DNA tranzistor, když spojili kovové elektrody vláknem lambda-DNA. Při měření funkce zařízení pozorovali Coulombovu blokádu a oscilace<sup>97</sup>.

V roce 2003 měřili T. Shigematsu et al z Fuji Xerox, Co. elektrické vlastnosti DNA a mj. použili uspořádání tranzistoru řízeného polem (FET). Molekula DNA byla nanesena na SiO<sub>2</sub> podložku. Vzdálenost mezi emitorem a kolektorem byla cca 20 nm. Po přiložení napětí na hradlo byl detekován proud mezi emitorem a kolektorem 0,5-2 nA a zjištěna vodivost DNA alespoň na krátkou vzdálenost<sup>98</sup>.

Vývoj DNA-FET dále pokračuje. Nicméně, z výše uvedeného vyplývá, že vývoj probíhá pomalu a je velmi obtížný. Paralelně s vývojem DNA-FET probíhá mnohem intenzivněji vývoj CNFET (tranzistor řízený polem s uhlíkovou nanotrubicí, která slouží jako kanál pro tok elektronů). Tento tranzistor byl poprvé zkonstruován v roce 1998 v laboratoři C.Dekker v Holandsku<sup>99</sup>. Prozatím nedošlo k průmyslové výrobě CNFET. Očekává se však, že CNFET by mohl v budoucnu nahradit křemíkové tranzistory. Současné top-down technologie (např. fotolitografie) však nemohou pracovat v rozměrech tak malých, jak se požaduje (v nanorozměrech), a proto se hledají možnosti použití technologie samosestavování (bottom-up). Jelikož DNA se jeví jako optimální templát pro samosestavování nanoelektrických zařízení, začal výzkum i v tomto směru. Na **obr. č. 34** je ideové znázornění CNFET pro biosenzor s imobilizovanou ss-DNA na jednotěnné uhlíkové nanotrubicí (SWCNT).

V roce 1998 K.Keren et al zveřejnili informaci o použití DNA při samosestavování CNFET technologií, kterou nazvali sekvenčně specifickou molekulární litografií<sup>100,101</sup> - viz **obr. č. 35**. Realizace CNFET začíná polymerizací monomerů proteinu RecA<sup>102</sup> na molekule ssDNA, přičemž se vytvoří nukleoproteinová vlákna (tento cyklus není uveden na obrázku). V dalším stupni procesu se nukleoproteinová vlákna spojí homologní rekombinací s dsDNA substrátem (smísí se). Homologní rekombinace je proces zprostředkovaný proteinem, při kterém dvě DNA molekuly (ssDNA a dsDNA), mající stejné uspořádání sekvencí, se spojí na ekvivalentních místech. Odděleně byl připraven roztok uhlíkových nanotrubic, ve kterém byly nanotrubice povlečeny streptavidinem. Ten se svázal za přítomnosti speciálně připravené protilátky (biotin-antimouse) s místy, kde byl na DNA protein RecA. Tak se nanotrubice

<sup>95</sup> Aviram A., Ratner M.A. „Molecular Rectifiers“, Chem. Phys. Lett, 79, 1974, str. 277.

<sup>96</sup> Ben-Jacob E. et al „DNA-Nanoelectronics: Realization of a Single Electron Tunneling Transistor and a Quantum Bit Element“, 6th Foresight Conference on Molecular Nanotechnology, 1998, Santa Clara CA, [www.foresight.org/conference/MNT6/Abstracts/Ben-Jacob/index.html](http://www.foresight.org/conference/MNT6/Abstracts/Ben-Jacob/index.html).

<sup>97</sup> Wu M.W., Sohn L.L. „A Single-Electron DNA Transistor“, APS March Meeting, 2001, příspěvek L.9.004. <http://flux.aps.org/meetings/YR01/MAR01/abs/S4190004.html>.

<sup>98</sup> Shigematsu et al „Transport Properties of Carrier-injected DNA“, J. Chem. Phys., 118, 2003, str. 4245.

<sup>99</sup> Tan S.J., Verschuren A.R.M., Dekker C. „Room-temperature Transistor Based on a Single Carbon Nanotube“, Nature, 393, 1998, str.49.

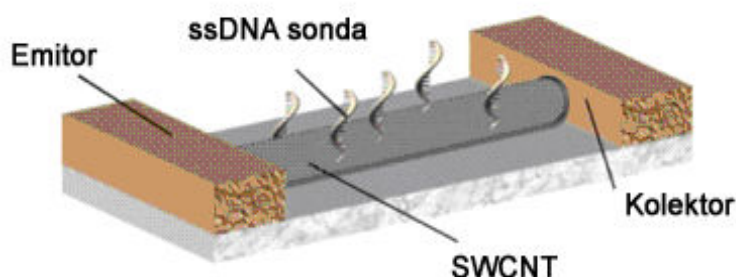
<sup>100</sup> Keren K. et al „DNA-templated Carbon Nanotube Field-effect Transistor“, Science, 302. 2003, str. 1380.

<sup>101</sup> Keren K et al „Sequence-specific Molecular Lithography on Single DNA Molecules“, Science, 297, 2002, str 72.

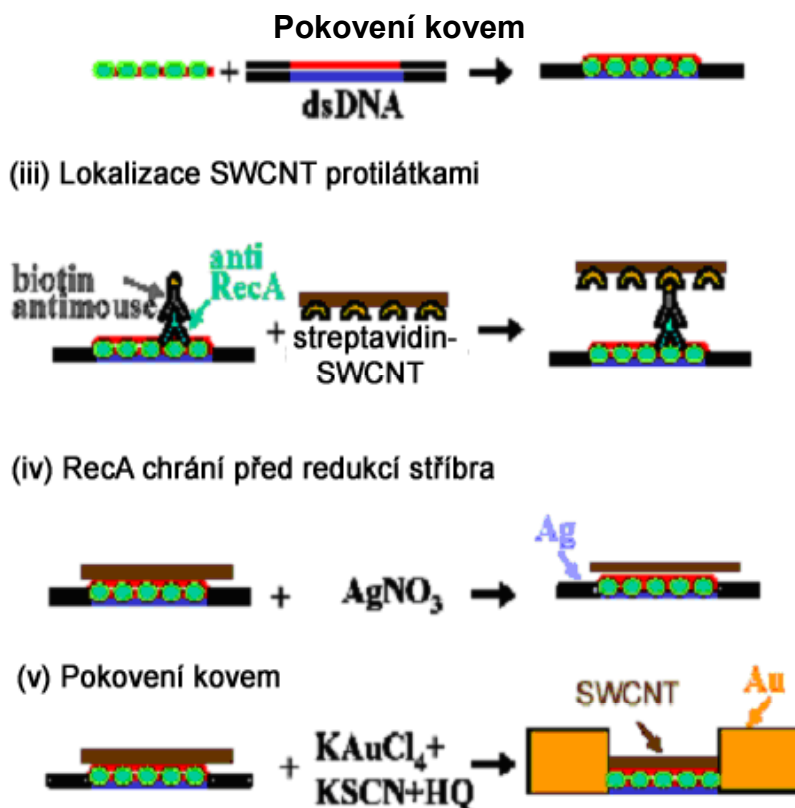
<sup>102</sup> **RecA protein** je jeden z nejzajímavějších proteinů, nespecificky vázaných k DNA v *E.coli*.

spojila s DNA. Inkubace v roztoku  $\text{AgNO}_3$  měla za následek tvorbu Ag agregátů podél molekul substrátu v oblastech, které nebyly chráněny proteinem RecA. Následovala operace, při které agregáty Ag sloužily jako katalyzátory pro specifickou depozici Au. Nechráněné oblasti se přeměnily na vodivé zlaté drátky (HQ na obr. 35 je hydrochinon). Vzniklá soustava byla poté umístěna na hradlo ze Si substrátu a vytvořil se CNFET.

Studium architektury nanoelektronických systémů samosestavených prostřednictvím DNA provádějí C. Dwyer et al z Duke University, NC<sup>103</sup>. Vycházejí z představy možnosti použití nanomřížky z DNA (viz obr. č. 31), na jejíž stěny by se umístily uhlíkové nanotrubičky. Autoři modelovali několik struktur a předložili jejich nesporné přednosti proti stávajícím integrovaným obvodům vyráběným technologií 180 nm. Uplatnění DNA nanoelektroniky lze očekávat v horizontu 10-15 let.



Obr. č. 34 Představa CNFET pro biosenzor s imobilizovanou SS-DNA na SWCNT



Obr. č. 35 Schéma technologie samosestavování CNFET pomocí templátu DNA

<sup>103</sup> Dwyer C. et al „Design Tools for a DNA-guided Self-assembling Carbon Nanotube Technology“, Nanotechnology, 15, 2004, str. 1340.

#### 4.3.9.2.8. DNA počítače

Molekulární počítače jsou snem a cílem od začátku rozvoje nanotechnologií. Jejich možnou realizaci předpověděl R.Feynman ve své památné přednášce na zasedání Americké fyzikální společnosti v California Technology Institute v roce 1959<sup>104</sup> a do současné doby bylo předloženo množství schémat. Předpokládá se, že první počítače tohoto typu budou využívat biologické molekuly. Hlavním kandidátem je DNA. Je to proto, že jeden gram DNA o objemu 1 cm<sup>3</sup> může obsahovat asi 750 terabytů informací<sup>105</sup>.

Výzkum v oblasti DNA počítání zahájil americký matematik L.Adleman z University of Southern California v roce 1994<sup>106</sup>. Adleman se v té době zabýval mechanismem šíření viru HIV a činností lidského imunitního systému a zaujala ho nápadná podobnost biologických procesů se základními procesy výpočetních systémů. Adlemanův experiment řešil problém nalezení hamiltonovské cesty (HPP) v sedmibodového grafu<sup>107</sup>. Klíčem k řešení HPP pomocí DNA byl masivní paralelizmus DNA výpočtů a komplementarita bazí.

Využití vlastností DNA pro počítání se těší velkému zájmu<sup>108</sup> a postupně se dospělo k realizaci konstrukce prvního DNA počítače. V roce 2004 E.Shapiro et al z Weizmannova ústavu v Izraeli publikovali v časopise Nature sdělení o DNA počítači, který je schopen diagnostikovat rakovinnou aktivitu v buňce a poté uvolnit protirakovinný lék<sup>109</sup>.

DNA počítače mají obecně tyto nevýhody:

- Spotřebovávají sice polynomiální množství času, avšak exponenciální množství prostoru. Např. pro graf, který má 100 bodů (v Adlemanově experimentu) je zapotřebí více než 10<sup>30</sup> molekul.
- Výpočty jsou zatím mnohem pomalejší než na PC
- Technologie je citlivá na výskyt chyb
- Výpočty nejsou znovu použitelné

DNA počítače mají tyto výhody:

- Masivní paralelizmus
- Nízká spotřeba energie k provedení výpočtu (jde o chemické reakce)
- Miniaturizace (obrovská informační kapacita)
- Silný rozvojový potenciál

Vývoj DNA počítačů je nyní přibližně v době, ve které křemíkové počítače byly krátce po objevu tranzistoru.

---

<sup>104</sup> Feynman R.P. "Tam dole je spousta místa", překlad uvedený v knize: R.F.Feynman „Radost z poznání“, vyd. Aurora, Praha, 2003, str. 159, ISBN 80-7299-068-3.

<sup>105</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_computer](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_computer)

<sup>106</sup> Adleman L.M. „Molecular Computation of Solution to Combinatorial Probléme“, Science, 266, 1994, str. 1021.

<sup>107</sup> **Problém hamiltonovské cesty** (Hamiltonian path problem - HPP) a problém hamiltonovského cyklu (Hamiltonian cycle problem – HCP) patří do teorie grafů. Jde o určení, zda v daném grafu tyto cesty existují. Máme-li graf se soustavou bodů a označeným vstupním a výstupním bodem, pak cesta ze vstupního do výstupního bodu se nazývá hamiltonovskou tehdy, když obsahuje každý bod grafu jen jednou.

<sup>108</sup> a) Winfree E. „DNA Computing by Self-assembly“, NAEs The Bridge, 33. 2003, No. 4, str. 31.

b) Mao Ch. et al „Logical Computation Using Algorithmic Self-assembly of DNA Triple-crossover Molecules“, Nature, 407, 2000, str. 493.

c) Benenson Y. et al „DNA Molecule Provides a Computing Machine with both Data and Fuel“, PNAS, 100, 2003, str 2191.

<sup>109</sup> Benenson Y. et al „An Autonomous Molecular Computer for Logical Control of Gene Expression“, Nature, 429, 2004, str.423.

### 4.3.9.3. RNA nanotechnologie

Jako perspektivní stavební jednotky pro použití v nanotechnologiích byly v minulosti zkoumány DNA a proteiny. Dalšímu potenciálnímu stavebnímu prvku – RNA – byla věnována mnohem menší pozornost. Přitom je známo, že s RNA se může manipulovat mnoha způsoby a vytvářet tak různé konformace, které mohou sloužit např. v DNA nanotechnologii založené především na jednoduché dvojšroubovicové struktuře. Přírodní molekuly RNA se mohou projevovat opravdu ve velmi velkém množství komplexních 3D struktur, které mohou plnit velmi rozdílné funkce. Snad nejlepším příkladem je ribozom, fantastický stroj založený na RNA (viz část 4.2.2.).

RNA nanotechnologie se rozvinula především na dvou pracovištích – na University of California v Santa Barbara (v laboratoři L. Jaegera) a na Purdue University (v laboratoři P. Gua).

L. Jaeger, ještě jako pracovník francouzského ústavu CNRS – Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire ve Štrasburku, předložil v roce 1996 koncepci RNA-tektoniky<sup>110</sup>. RNA-tektonika se zabývá konstrukcí umělých RNA architektur, které mají nové vlastnosti a přispívá k pokroku v poznání principů skládání a sestavování trojrozměrných komplexních přírodních molekul RNA. RNA-tektoniku lze považovat za stavebnici LEGO, kdy z modulárních jednotek zvaných „tektRNA“ se vytvářejí samosestavováním superstruktury<sup>111</sup>. L. Jaeger et al postupně popsali konstrukci modulárních RNA jednotek ve tvaru dimeru<sup>112</sup>, H-tvaru a čtvercového tvaru, které se mohou skládat do různých nanostruktur, jako např. malých RNA nanočástic, jedno- a dvojdimenzionálních uspořádání nebo pravidelných sítí. Předpokládá se uplatnění RNA-tektoniky v nanotechnologii, biotechnologii a medicíně.

P. Guo shrnul nedávno mnohaletou činnost své laboratoře v oblasti RNA nanotechnologie<sup>113</sup>. Vyjádřil přesvědčení, že RNA je unikátní molekula pro nanovýrobu pro množství svých funkcí struktur. Molekuly RNA mohou být konstruovány a manipulovány jednoduchými postupy srovnatelnými s DNA, avšak při variacích struktury a funkcí pozorovaných u proteinů. Molekuly RNA typicky obsahují velmi rozdílné jednořetězcové smyčky, vhodné pro inter- a intramolekulární interakce. Tyto smyčky mohou sloužit jako montážní rybiny používané obvykle při spojování součástí. Samosestavování nanočástic z RNA zahrnuje kooperativní interakce jednotlivých molekul RNA, které se spontánně sestavují do předem definovaných tvarů a vytvářejí větší dvoj- a trojdimenzionální struktury.

Práci laboratoře P. Gua charakterizují následující příklady:

- Syntéza 30 nm pRNA motoru zhotoveného z šesti řetězců RNA, uspořádaných do hexameru, které vážou ATP a obklopují střední řetězec DNA. V přítomnosti ATP stlačují RNA řetězec DNA osu, roztácejí ji a vytváří se síla cca 50 pN<sup>114</sup>.
- Syntéza nanostruktur a uspořádaných souborů použitím pRNA bakteriofágu phi29. pRNA se svými neobvyklými strukturními a funkčními vlastnostmi je ideální výchozí

<sup>110</sup> Westhof E., Masquida B, Jaeger L „RNA Tectonics: Towards RNA Design“, *Folding & Design*, 1, 1996, str. R 78.

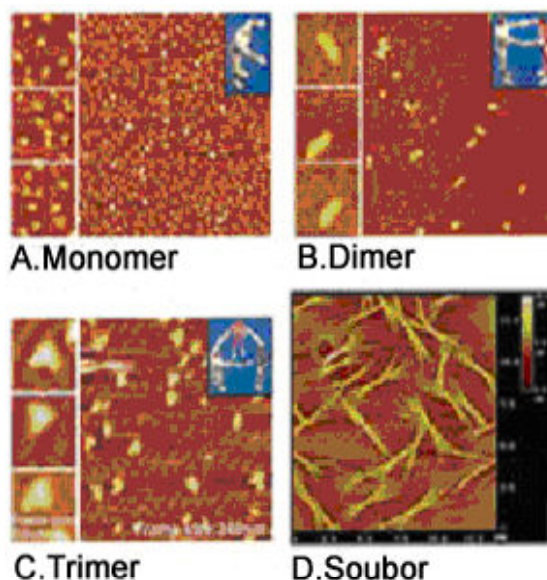
<sup>111</sup> Jaeger L, Westhof E., Leontin N.B. „TectoRNA: Modular Assembly Units for the Construction of RNA Nano-objects“, *Nucleic Acid Res.*, 29, 2001, str. 455.  
Choros A et al „Building Programmable Jigsaw Puzzles with RNA“, *Science*, 306, 2004, str. 2066.  
Nasalean L. et al „Controlling RNA Self-assembly to Form Filaments“, *Nucleic Acid Res.*, 34, 2006, str. 1381.

<sup>112</sup> **Dimer** – sloučenina ze dvou molekul těžé látky

<sup>113</sup> Guo P. „RNA Nanotechnology: Engineering, Assembly and Applications in Detection, Gene Delivery and Therapy“, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 5, 2005, str. 1964.

<sup>114</sup> Shu D, Guo P. „A Viral RNA that Binds ATP and Contains a Motif Similar to an ATP-binding Aptamer from SELEX“, *J. Biol. Chem.*, 278, 2003, str. 7119.

materiál pro RNA nanotechnologie. Byly syntetizovány pRNA molekuly, které v prostředí bez proteinů vytvářejí s vysokou účinností stabilní dimery a trimetry. Tyto stavební bloky jsou schopny se samosestavovat do tyčinek, trojúhelníků, hexamerů a 3D struktur o rozměrech až několika mikrometrů. Uspořádané soubory byly stabilní v různých prostředích. Výsledky naznačují, že RNA může sloužit jako všestranný stavební blok v nanotechnologiích – **obr. č. 36**<sup>115</sup>.



**Obr. č. 36** Struktury vytvořené z pRNA.

- Byla syntetizována pRNA motoru bakteriofágu phi 29 obsahující terapeutickou siRNA a na receptory se vážící RNA aptamery<sup>116</sup>. Vzniklé nanočástice o rozměrech 20-40 nm se vážaly na terapeutické částice v buňkách a postupně iniciovaly zánik rakovinných buněk v buněčných kulturách a při pokusech na zvířatech. Je dobrý předpoklad pro využití nanočástic při léčbě rakoviny a leukémie<sup>117</sup>.

#### 4.3.9.4. Peptidy a proteiny v nanotechnologiích

Unikátní a univerzální vlastnosti přírodních proteinů, zejména enzymů, byly a jsou dostatečnou hnací silou pro přípravu **syntetických peptidů a proteinů** v přírodě se nevyskytujících, které mají předem určené vlastnosti<sup>118</sup>. V posledních 20 letech bylo vyvinuto mnoho systémů samosestavování, od blokových kopolymerů a povrchově aktivních látek po trojrozměrné buněčné struktury, struktury založené na DNA a modely pro studium sbalování proteinů. Prozatím se samosestavováním (chemickou syntézou) podařilo připravit jen menší syntetické biologicky aktivní systémy, které mají jednoduché konformace, např. jedinou  $\alpha$  – šroubovici nebo  $\beta$  – strukturu či jejich kombinace. Zatím nejsme schopni předvídat terciární strukturu proteinů, což zatím vylučuje možnost přípravy nových funkčních proteinů

<sup>115</sup> Shu D. et al „Bottom-up Assembly of RNA Arrays and Superstructures as Potential Parts in Nanotechnology“, Nano Lett., 4, 2004, str. 1717.

<sup>116</sup> **Aptamery** – malé molekuly, které mají schopnost vázat se k jiným molekulám. (DNA nebo RNA aptamery, peptidové aptamery).

<sup>117</sup> Khaled A et al „Controllable Self-assembly of Nanoparticles for Specific Delivery of Multiple Therapeutic Molecules to Cancer Cells Using RNA Nanotechnology“, Nano Lett., 5, 2005, str. 1797-

<sup>118</sup> Zhang S. et al „Design of Nanostructured Biological Materials through Self-assembly of Peptides and Proteins“, Current Opinion in Chemical Biology, 6, 2002, str. 865

s komplexní konformací. Běžná je již syntéza peptidů obsahujících až 50 aminokyselin a podařilo se syntetizovat proteiny o 150 aminokyselinách.

Jeden z prvních pokusů o syntézu proteinů od samého počátku (*de novo*) popsali J.S. a D.C. Richardsonovi<sup>119</sup>. Vytvořili dva nové proteiny metodou vycházející ze základní předlohy sbalování přírodních proteinů. První protein, který nazvali „Felix“, byl modelován podle svazků čtyř  $\alpha$ -šroubovic a obsahoval 79 aminokyselin v chomáčích  $\alpha$ -šroubovic a zahrnoval 19 z 20 typů aminokyselin. Byl velmi nestabilní a neuspořádaný. Druhý protein nazvaný „betabellin“ byl modelován podle proteinu s dvěma  $\beta$ -strukturami. Po řadě rekonstrukcí byl získán stabilní, dobře rozpustný protein.

Samosestavování peptidů a proteinů je slibnou cestou pro přípravu různých molekulárních materiálů, včetně nanovláken a vláknitých trojrozměrných sítí (koster).

#### 4.3.9.4.1. Způsoby výběru peptidů pro přímé sestavování nanokrystalů

Pro využití peptidů a proteinů při vytváření nanostruktur je podstatný jejich optimální výběr, protože příroda nám nepřipravila vhodné biomolekulární interakce s materiály, které obvykle potřebujeme (kovy, polovodiče, oxidy ap.). Začátkem devadesátých let minulého století se pro výběr vhodných peptidů začalo využívat bakteriofágů<sup>120</sup> (viz např. S.B. Cwirla et al<sup>121</sup>).

S. Brown použil pro selektivní vazbu částic oxidů kovů ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) polypeptidy vyskytující se na povrchu bakterie *E. coli*<sup>122</sup>. Vytvořil knihovnu *E. coli* charakterizující nahodilé sekvence peptidů a s pomocí této knihovny identifikoval proteiny a peptidy, které měly schopnost přilnout k oxidům železa.

Podobné způsoby byly dále rozvíjeny. Popíšeme způsob zvaný **phage display**, využívaný v laboratoři Angely Belcher v MIT, který má svůj vzor v metodách používaných při výzkumu nových léků<sup>123</sup>. Schéma metody je uvedeno na **obr. č. 37**. Pro rychlý výběr peptidů, které by nejen rozpoznaly, ale i řídily růst specifických anorganických materiálů, byla použita knihovna geneticky upraveného fágu M 13<sup>124</sup>. Knihovna byla založena na kombinatoriální knihovně peptidů o dané délce (např. 7-12 merů), které jsou připojeny k malému povlakovému proteinu pIII vláknitého kolidágu M 13. Knihovna obsahovala  $1,9 \cdot 10^9$  nahodilých sekvencí. Tyto sekvence byly exponovány na různé krystalické substráty. Nespecifické peptidové interakce (vazby) byly odstraněny vymytím. Připojené fágy byly vymyty snížením pH roztoku a rozbitím interakcí s povrchem. Vymyté fágy byly amplifikovány jejich injektováním do *E. coli*, aby se vytvořila obohacená populace fágů s peptidy, které jsou schopny interakce se specifickou krystalickou strukturou. Zesílené fágy byly izolovány, byl zjištěn jejich počet v roztoku a znovu exponovány na čerstvě připravený povrch substrátu tak, aby se obohatila populace fágu. Tento postup byl opakován 5-7 krát, aby se vybral fág s nejpevnější a nejspecifičtější vazbou. Na závěr byla sekvencována DNA fágu, která

<sup>119</sup> Richardson J.S., Richardson D.C. „The *de novo* Design of Protein Structures“, Trends in Biochemical Sciences, 14, 1989, 304.

<sup>120</sup> **Bakteriofág** (zkráceně **fág**) je bakteriální vir, který je schopen replikace v hostitelské buňce mikroorganismů ze skupin bakterií a archeí. Fágy jsou schopny hybridizace s molekulami cDNA z knihovny cDNA. Fágy jsou nejpočetnějšími biologickými objekty v biosféře a jejich počet se odhaduje až na  $10^{31}$ . V současné době je popsáno asi 5100 fágů, které jsou klasifikovány do 13 čeledí, 30 rodů a 650 druhů. Viz [www.phage.org/names.htm](http://www.phage.org/names.htm)

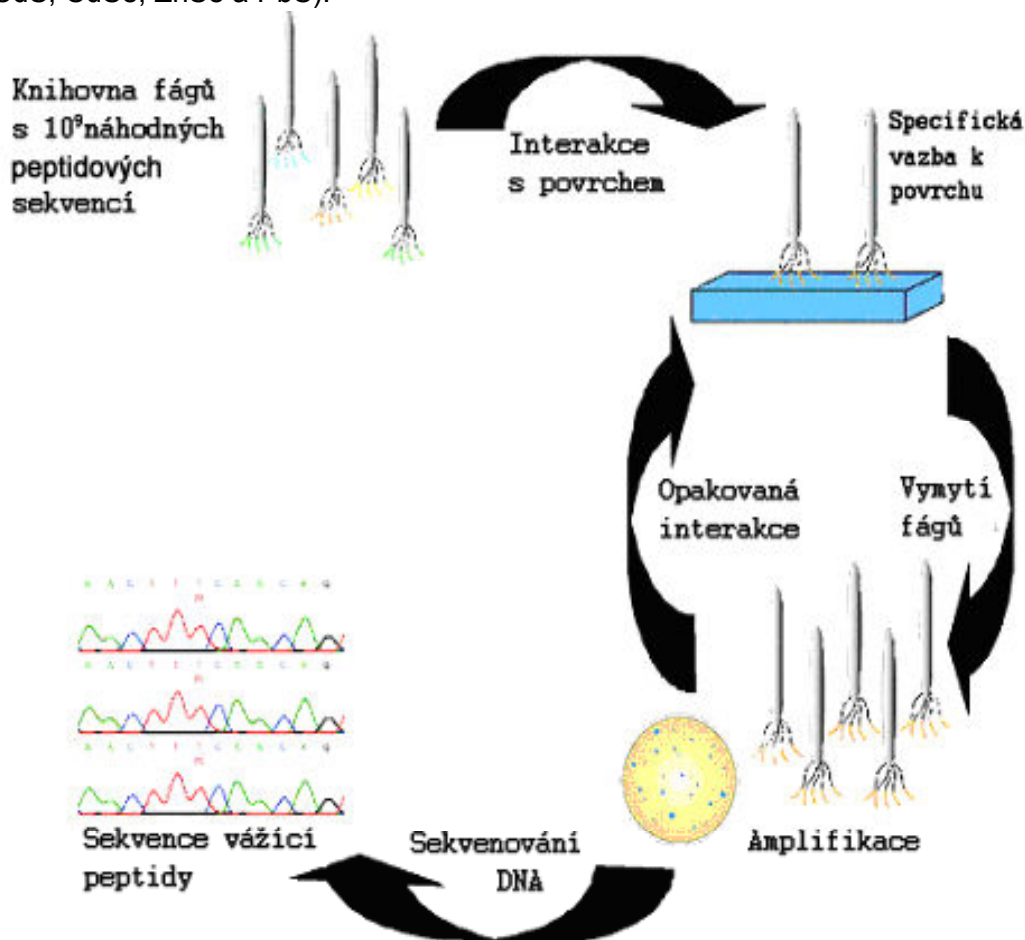
<sup>121</sup> Cwirla S.B. et al „Peptides on Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands“, PNAS, 87, 1990, str. 6378.

<sup>122</sup> Brown S. „Engineered Iron Oxide – adhesion Mutants of the *Escherichia coli* Phage  $\lambda$  Receptor“, PNAS, 89, 1992, str.8651.

<sup>123</sup> Seeman N.C., Belcher A.M. „Emulating Biology: Building Nanostructures from the Bottom up“, PNAS, 99, 2002, str. 6451; [www.science.org.au/sats2003/belcher.htm](http://www.science.org.au/sats2003/belcher.htm).

<sup>124</sup> **M 13 fág** – je vláknitý fág o průměru cca 6 nm a délce 880 nm.

projevuje potřebnou specifičnost a z této sekvence bylo možné získat informace o sekvencích vázající peptidy k povrchu substrátu. Postup byl použit pro identifikaci peptidů a proteinů, které se specificky váží k polovodičným nanočásticím (GaAs, InP, Si). Je to slibný přístup pro výběr peptidů, které mohou rozpoznat specifické anorganické krystaly a krystalografické orientace nebiologického původu, kontrolovat rozměr, krystalovou strukturu, tvar a optické vlastnosti polovodičových nanostruktur, včetně nanokrystalů ze skupiny II – VI (ZnS, CdS, CdSe, ZnSe a PbS).



**Obr. č. 37** Postup výběru peptidů rozpoznávajících anorganické nanostruktury metodou Phage display

#### 4.3.9.4.2. Peptidy a proteiny jako konstrukční materiály

V roce 1993 šťastnou náhodou objevili S. Zhang et al při samosestavování iontových vzájemně se doplňujících oligopeptidů novou třídu biologických materiálů založených na oligopeptidech<sup>125</sup>. Oligopeptidy byly krátké, jednoduše projektovatelné, velmi přizpůsobivé a snadno syntetizovatelné. Po deseti letech výzkumu<sup>126</sup> byla příprava těchto peptidů komercializována pod značkou PuraMatrix™. Je to *in situ* samosestavená trojrozměrná, na aminokyselinách založená hydrogelová kostra, sestávající z vláken krátkých fragmentů amfifilických oligopeptidů (16 aminokyselin, délka 5 nm). Průměr vláken je 7-10 nm, velikost ok sítě je 50-400 nm, tedy přibližně jako síť vláken *in vivo* v extracelulární matrix – **obr. č.**

<sup>125</sup> Zhang S. et al „Spontaneous Assembly of a Self-complementary Oligopeptide to Form a Stable Macroscopic Membrane“, PNAS, 90, 1993, str. 3334.

<sup>126</sup> Zhang S. „Building from the Botton up“, Materialstoday, May 2003, str. 20.



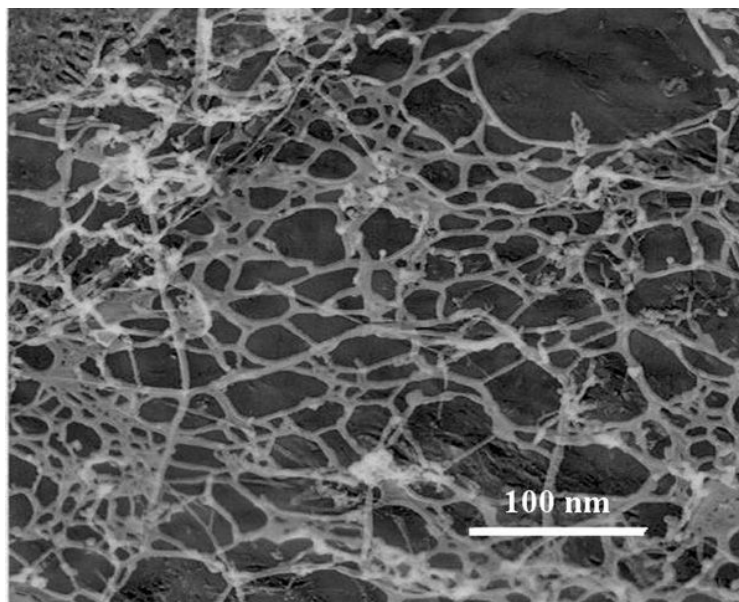
**38.** Využití tohoto nanomateriálu se předpokládá v různých etapách vývoje nových léků, při klinické terapii, tkáňovém inženýrství a biovýrobě.

Výše zmíněná samosestavující se peptidová nanovláknová kostra byla úspěšně použita při výzkumu možnosti opravy poraněných mozkových tkání křečka<sup>127</sup>.

P. Ringler a G.E. Schulz použili enzym aldolázu a samosestavováním vytvořili čtvercovou síť sestávající z enzymu jako pevného čtyřcestného konektoru a tuhých streptavidinových tyčinek jako mezerníků<sup>128</sup>. Každá podjednotka aldolázy byla vybavena terminálovou značkou (tag) hexa histidinu (His<sub>6</sub> tag) pro orientovanou vazbu k rovným povrchům a dvěma připojenými biotiny pro vazbu streptavidinu. Síť bylo možné reverzně nastavovat v krocích po 5 nm.

J.D. Hartgerink et al popsali samosestavování a mineralizaci<sup>129</sup> amfifilních peptidových nanovláken, ze kterých vytvořili vláknitou síť připomínající extracelulární matrix. Vlákna sítě mohou být mineralizována hydroxyapatitem a vytvořit kompozitní materiál, ve kterém je krystalografická osa c hydroxyapatitu vyrovnaná s dlouhou osou vláken. Podobné vyrovnávání pozorujeme mezi fibrilami kolagenu a krystaly hydroxyapatitu v kosti.

**Obr. č. 38** Struktura trojrozměrné sítě oligopeptidů materiálu PuraMatrix™ (transmisní elektronový mikroskop, podle <sup>130</sup>)



#### 4.3.9.4.3. Peptidy a proteiny jako templáty pro vytváření nanostruktur

Peptidy a proteiny byly použity rovněž jako templáty pro vytváření různých nanostruktur podobným postupem, jako je postup popsáný v části 4.3.9.4.1., byly vytvořeny uspořádané nanotečky ZnS<sup>131</sup>, Ag nanočástice<sup>132</sup> a poslední době nanočástice oxidu kobaltu, což je

<sup>127</sup> Ellis-Behnke R.G. et al „Nano Neuro Knitting: Peptide Nanofiber Scaffold for Brain Repair and Axon Regeneration with Functional Return of Vision“, PNAS, 103, 2006, str.5054.

<sup>128</sup> Ringler P, Schulz G.E. „Self-assembly of Proteins into Designed Networks“, Science, 302, 2003, str. 106.

<sup>129</sup> Hartgerink J:D: et al „Self-assembly and Mineralization of Peptide-amphiphile Nanofibers“, Science, 294, 2001, str. 1684; „Peptide-amphiphile Nanofibers: A Versatile Scaffold for the Preparation of Self-assembled Materials“, PNAS, 99, 2002, str. 5133.

<sup>130</sup> www.puramatrix.com

<sup>131</sup> Lee S.-W- et al „Ordering Quantum Dots Using Genetically Engineered Viruses“, Science, 296, 2002, str.892.

materiál s vyšší kapacitou pro uskladňování energie než mají současné na uhlíku založené Li iontové baterie.

Pomocí seskupení vysoce uspořádaných proteinů byly vytvořeny uspořádané soubory nanočástic<sup>133</sup>. Na upravených templátech proteinu chaperoninu byly vytvořeny uspořádané soubory nanočástic (nanoteček) Au a CdSe-ZnS<sup>134</sup>. Templáty peptidových nanovláknem obohacených histidinem byly použity pro vytvoření nanodrátků Au<sup>135</sup>.

Amfifilické peptidové šroubovice byly použity při řízeném sestavování uhlíkových nanotrubic<sup>136</sup>. Pro růst nanokrystalů Cu biomineralizací byly použity peptidové nanotrubic<sup>137</sup>. V literatuře lze nalézt četné další příklady.

#### 4.3.9.4.4. Motorové proteiny

O molekulárních motorech jsme se stručně zmínili v kapitole 4.3.7. Tyto přírodní motory mají rozměr cca 2 – 20 nm, tj. jsou o tři řády menší, ve srovnání se současnými pokrokovými mikromotory vyrobenými mikrotechnologiemi, jako např. rtg. litografií a povrchovým mikroobráběním. Biomolekulární motorové proteiny přeměňují chemickou energii na mechanickou práci nebo pohyb. Jsou energeticky nenáročné a velmi účinné, navíc pracují při přijatelných teplotách. Motorové proteiny se účastní různých kritických buněčných procesů a plní různé funkce jako syntézu ATP, transport organel, kontrakci svalů, skládání proteinů a pod. Jsou rozhodující při signalizaci buněk, jejich dělení a pohybu.

Existují tři základní typy molekulárních motorů, které jsou vhodné pro využití v nanotechnologiích – konstruované shora – dolů (top – down), konstruované chemicky a biologické molekulární motory (motorové proteiny). Motorové proteiny jsou předmětem rozsáhlého výzkumu zaměřeného na poznání jejich funkcí v různých organizmech a studium možností napodobení jejich činnosti<sup>138</sup>.

K. Firman et al pokračují, i po ukočení evropského projektu Nanonet, ve vývoji nanoaktuátoru založeného na molekulárním biomotoru (hybridním enzymu), který pohybuje DNA a jako „palivo“ mu slouží ATP. Autoři demonstrovali možnosti motoru pohybovat „velkým“ objektem na vzdálenost mnoha mikrometrů při použití magnetické pinzety. Použitá paramagnetická částice měla průměr cca 1 μm a nejdelší vzdálenost, po kterou byla pohybována byla cca 3 μm. Generovaná síla byla asi 8 pN. Nanoaktuátor by měl být schopen detekovat pohyb biokompatibilních magnetických nanočástic připojených k DNA. Motor je rovněž schopen sledovat šroubovicovou strukturu DNA a uvést připojené částice do rotace. Dalším cílem je

---

<sup>132</sup> Naik R.R. et al „Biomimetic Synthesis and Patterning of Silver Nanoparticles“, Nature Materials, 1, 2002, str. 169.

<sup>133</sup> Behrens S. et al „Nanoscale Particle Arrays Induced by Highly Ordered Protein Assemblies“, Advanced Materials, 14, 2002, str. 1621.

<sup>134</sup> McMillan R.A. et al „Ordered Nanoparticle Arrays Formed on Engineered Chaperonin Protein Templates“, Nature Materials, 1, 2002, str. 247.

<sup>135</sup> Djalali R et al „Au Nanowires Fabrication from Sequenced Histidine-rich Peptide“, J. Am. Chem. Soc., 124, 2002, str. 13660.

<sup>136</sup> Dieckmann G.R et al „Controlled Assembly of Carbon Nanotubes by Designed Amphiphilic Peptide Helices“, J. Am. Soc., 125, 2003, str. 1770.

<sup>137</sup> Banerjee Ipsita A., Yu L, Matsui H. „Cu Nanocrystal Growth on Peptide Nanotubes by Biomineralization: Size Control of Cu Nanocrystals by Tuning Peptide Conformation“, PNAS, 100, 2003, str. 14678; Gao X., Matsui H. „Peptide-based Nanotubes and Their Applications in Bionanotechnology“, Advanced Materials, 17, 2005, str. 3037.

<sup>138</sup> a) Nicolau D.V. „Nanodevices Based on Protein Molecular Motors: An Engineering Approach“, Springer, 2006, ISBN 0387307559; b) Tech. Proc. 2004 NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show, vol. 1, chapter 3: „Biomolecular Motors“ – [www.nsti.org/procs/Nanotech2004v1/3](http://www.nsti.org/procs/Nanotech2004v1/3)

připojení motoru ke křemíku. To umožní vývoj integrovaného systému, který by mohl být použit jako biosenzor a pro sekvenování jedné molekuly DNA<sup>139</sup>.

S. Klumpp et al studují transport „nákladních“ částic, které jsou taženy různými molekulárními motory navzájem spolupracujícími. Předmětem studia jsou kinesin motory, které se pohybují v cytoskeletu podél vláken aktinu. Pro porozumění dopravě uvnitř buňky je zapotřebí zkoumat kooperaci mezi motory. Ukázalo se např., že dopravní vlastnosti závisí především na maximálním počtu motorových proteinů, které se podílejí na tažení dopravované částice. Dalším významným důsledkem kooperační činnosti motorů je, že se zvětšuje délka jednotlivých kroků. Kinesin je dimerický protein s dvěma nohama (**obr. č. 26**), který se pohybuje podél vlákna aktinu v určitých krocích. Každý krok odpovídá asi velikosti motoru, tj. cca 8 nm. Za jednu vteřinu vykoná motor asi 100 kroků, což je rychlost cca 1 mikrometr za vteřinu. Absolutní hodnota této rychlosti nedělá velký dojem, avšak v poměru k velikosti se motorová molekula pohybuje velmi rychle. V makroměřítku odpovídá tento pohyb rychlosti atleta, který běží rychlostí 200 m/sec. Přitom je třeba mít na paměti, že motor pracuje ve viskózním prostředí a je podrobován neustálým kolizím s velkým množstvím molekul vody. Vlivem těchto kolizí pracují tyto motory vždy jen na určité délce vlákna. Po několika vteřinách se odpojí od vlákna a pohybují se v obklopující vodě Brownovým pohybem, dokud se opět nepřipojí na stejné nebo jiné vlákno. Studium těchto jevů je nezbytné pro konstrukci syntetických motorových proteinů<sup>140</sup>.

Největší pozornost výzkumníků připoutal proteinový motor  $F_0F_1$  ATP syntáza (**obr. č. 27**). V roce 1997 uveřejnili H. Noji et al informaci o přímém pozorování rotace motorového proteinu  $F_1$ -ATP syntázy<sup>141</sup>.

Jeden z prvních pokusů o syntézu zařízení s tímto motorem uskutečnili C. Montemagno a jeho skupina. Sestrojili hybridní nanomechanické zařízení poháněné přírodním proteinovým motorem. Zařízení sestávalo ze tří částí: mechanického niklového substrátu (výška 200 nm, průměr 80 nm), biomotoru  $F_1$ -ATP syntáza a syntetické nanovrtule z Ni o délce 750 nm a průměru 150 nm. Motor byl ponořen do roztoku ATP a jiných chemikálií. Rotace vrtule byla iniciována 2 mM ATP a zastavována azidem sodným. Rychlost rotace byla v rozmezí 1-8 ot./sec, v závislosti na délce vrtule a místě jejího uchycení. Zařízení pracovalo plynule po 2 hodiny se středním krouticím momentem cca 20 pN.nm při 50 % účinnosti. Pouze 5 zařízení z 400 však pracovalo podle předpokladů.<sup>142</sup>

Poměrně nedávno H. Itoh et al předložili přímý důkaz chemické syntézy ATP poháněné mechanickou energií, když připojili k  $\gamma$ -podjednotce motoru magnetickou kuličku a otáčeli s ní<sup>143</sup>. Rotace správným směrem měla za následek výrobu ATP.

#### 4.3.9.4.5. Peptidy, proteiny a nanoelektronika

Jeden ze základních cílů bioelektroniky je realizace zařízení v nanorozměrech, ve kterých pro přenos a zpracování elektronického signálu se používá několik málo nebo jen jedna biomolekula. Existuje několik problémů: imobilizace molekuly na elektronickém substrátu,

<sup>139</sup> Firman K. „A Biological Molecular Motor with the Potential to Be a Self-assembling Nanoactuator“, Proc.Int.Conf „NANO 04“, CSNMT, Brno, Oct. 2004, str. 131.

<sup>140</sup> Klumpp S., Lipowsky R. „Cooperative Cargo Transport by Several Molecular Motors“, PNAS, 102, 2005, str. 17284; Klumpp S. et al „Self-organizing Density Patterns of Molecular Motors in Arrays of Cytoskeletal Filaments“, Biophysical Journal, 88, 2005, str. 3118.

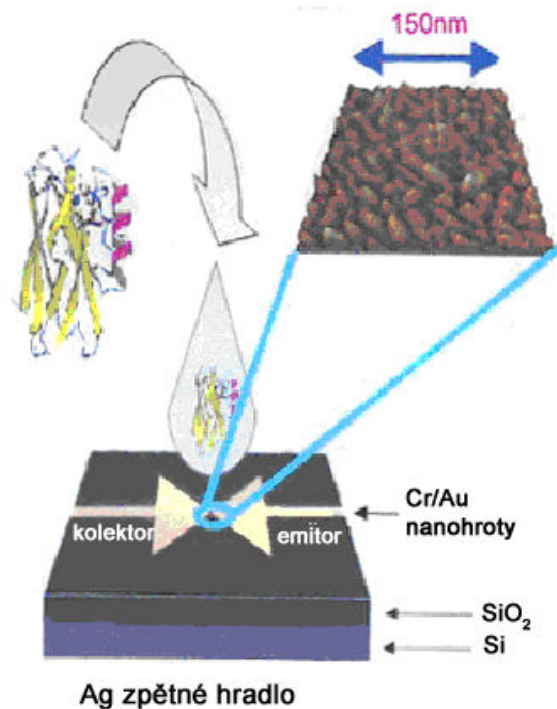
<sup>141</sup> Noji H. et al „Direct Observation of the Rotation of  $F_1$ -ATPase“, nature, 386, 1997, str. 299.

<sup>142</sup> C. Montemagno et al „Constructing Biological Motor Powered Nanomechanical Devices“, Nanotechnology, 10, 1999, str 225; Soong R.K et al „Powering an Inorganic Nanodevice with a Biomolecular Motor“, Science, 290, str, 1555.

<sup>143</sup> Itoh H et al „Mechanically Driven ATP Synthesis by  $F_1$  – ATPase“, Nature, 427, 2004, str. 465.

spojení kontaktů, výroba zařízení, vytvoření výstupu a zpracování informací. Mezi biomolekulami mají výsadní místo proteiny. Pro vytváření biomolekulárních zařízení pro nanoelektroniku byly doposud použity různé nanotechnologické strategie (bottom-up i top-down).

R. Rinaldi et al došli k názoru, že vhodným kandidátem pro biomolekulární elektroniku jsou metaloproteiny, a to pro své dobré funkční charakteristiky. Z metaloproteinů je to zejména azurin – modrý měděný protein. Může se vázat na zlato prostřednictvím disulfidového místa nacházejícího se na povrchu proteinu. Jeho přirozená aktivita při přenosu elektronů může být využita pro realizaci molekulárních spínačů, jejichž vodivostní stav může být řízen laděním jejich redoxního stavu prostřednictvím externího zdroje napětí (hradla). Vytvořili prototyp ambipolárního FET tranzistoru – **obr. č. 39**. Vložený snímek z AFM zachycuje molekuly azurinu imobilizované na substrátu Si/SiO<sub>2</sub>. Zařízení bylo funkční<sup>144</sup>.

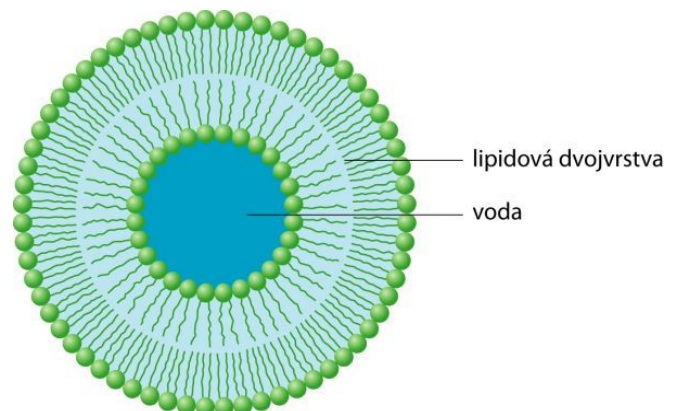


**Obr. č. 39** Schéma geometrie FET tranzistoru a způsob jeho vytvoření.

#### 4.3.9.5. Využití lipidů v nanotechnologiích

##### 4.3.9.5.1. Liposomy

Liposomy jsou uměle připravené uzavřené váčky (vezikuly) tvořené jednou nebo několika lipidovými dvojvrstvami a vnitřním izolovaným kompartmentem obsahujícím vodný roztok - **obr. č. 40**.



**Obr. č. 40** Liposom

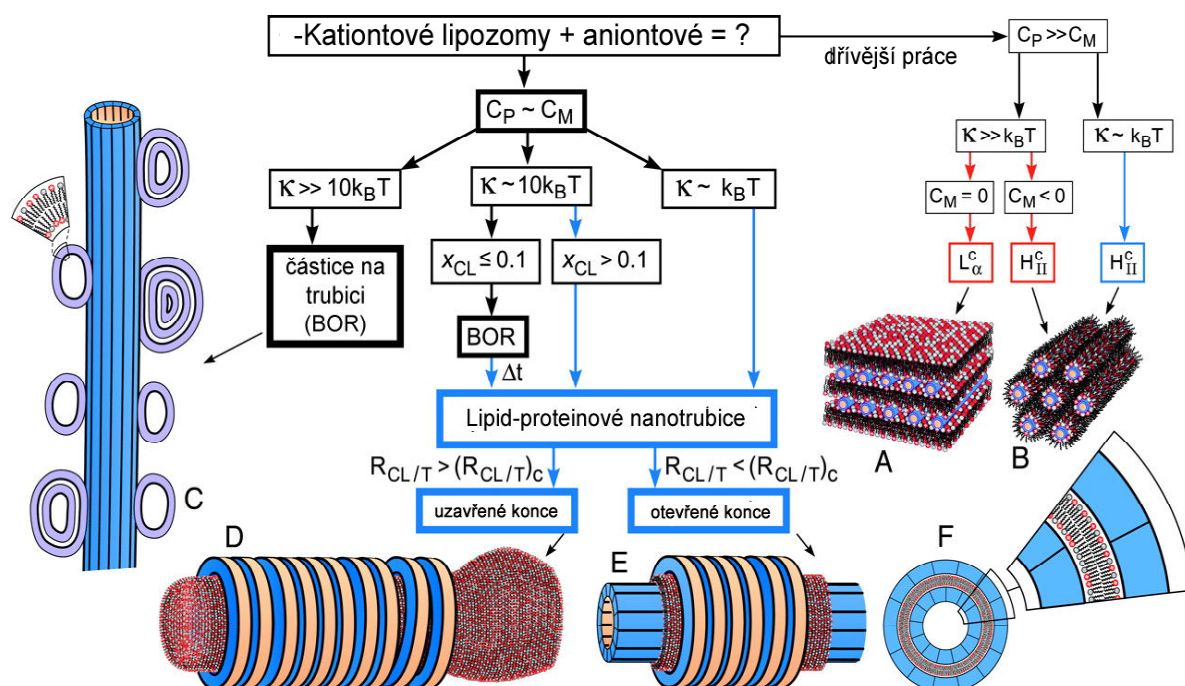
<sup>144</sup> D'Amico S. et al „Ambipolar Transistors Based on Azurin Proteins“, IEE Proc. Nanobiotechnol., 151, 2004, str. 173.

Liposomy byly poprvé připraveny v roce 1961 anglickým vědcem A.D. Banghamem a od té doby se staly mnohostanně použitelným nástrojem v biologii, biochemii a nanomedicině. V roce 1972 byly poprvé použity pro systém dopravy léků a v roce 1997 pro prvou vakcínu DNA na bázi lipidů<sup>145</sup>. Zatím co tloušťka lipidové dvojvrstvy dosahuje několika nm, jejich průměr se podle potřeby může lišit od cca 10 nm až po několik mikrometrů. Liposomy se připravují z přírodních netoxických fosfolipidů a cholesterolu několika způsoby, např. působením ultrazvuku na vodnou suspensi vhodných polárních lipidů (nejčastěji se pro tento účel používá lecitin z vaječného žloutku). V případě použití liposomu pro dopravu léků v organismu jsou obvykle váčky rozpoznány a zničeny imunitním systémem, a proto se váčky povlékají, např. polyetylen glykolem (PEG)<sup>146</sup>.

#### 4.3.9.5.2. Komplexy liposom – proteinové nanotrubičky

U. Raviv et al z University of California, Santa Barbara, studovali biomolekulární interakce mezi nabitými membránami a biologickými polyelektrolyty<sup>147</sup>, které vedou k rozdílným strukturám a morfologiím. Struktury vznikající samosestavováním jsou schematicky znázorněny na **obr. č. 41**. Jsou zde uvedeny i příklady dřívějších prací. Kationové liposomové váčky byly buď adsorbovány na anionových nanotrubicích za tvorby struktury „částice na trubce“ (beads on a rod) – na obr. 41 je to označeno jako **C**, nebo za jiných podmínek jako lipid-proteinové nanotrubičky, a to s uzavřenými konci (**D**) nebo otevřenými konci (**E**). Řez tímto komplexem je označen jako **F**.

Dřívější práce, prováděné za jiných podmínek, vedly ke strukturám **A** a **B**<sup>148</sup>. Předpokládá se využití těchto struktur při cílené dopravě léků.



**Obr. č. 41** Struktury komplexů liposom – polyelektrolyt

<sup>145</sup> [www.liposome.org](http://www.liposome.org)

<sup>146</sup> [www.alza.com/alza/stealth](http://www.alza.com/alza/stealth)

<sup>147</sup> **Polyelektrolyt** je vysokomolekulární látka, která obsahuje postranní skupiny schopné elektrolytické disociace. Skupiny mohou být kyselé, zásadité (zřídka) a amfoterní (v uvedeném případě proteiny).

<sup>148</sup> Raviv U. et al „Cationic Liposome – Microtubule Complexes: Pathways to the Formation of Two-state Lipid-protein Nanotubes with Open and Closed Ends“, PNAS, 2005, str. 11167.

#### 4.3.9.5.3. Lipidové nanotrubic

T. Shimizu z Nanoarchitectonics Research Center japonského ústavu AIST vytvořil lipidové nanotrubic, které nazval „bílé nanotrubic“<sup>149</sup>. Nanotrubic se vyrábějí jednoduchým způsobem ze slupky oříšků kešu. Nanotrubic mají vnitřní průměr 10 – 15 nm, vnější průměr 40 – 50 nm a mohou dosahovat délky několik desítek až stovek mikrometrů. Podařilo se např. naplnit nanotrubic zlatem, když se do nich naplnil vodný roztok tetrachloraurátu a zlato vyprecipitovalo po UV ozáření. Základní vlastnosti a další využití lipidových nanotrubic jsou předmětem zkoumání<sup>150</sup>.

#### 4.3.9.6. Další biologické objekty

Vedle zmíněných DNA, RNA, proteinů, lipidů a virů byly pro vytváření nanočástic a nanostuktur použity další biologické objekty. Uvedeme jen několik příkladů.

J.L.Gardea-Torresday et al popsali jako první vznik a růst nanočástic zlata uvnitř živé rostliny alfalfa (otec všech potravin). Rostlina vyrůstala v prostředí bohatém na  $\text{AuCl}_4$ <sup>151</sup>.

Jako organický templát pro řízenou depozici a organizaci Pt, Au a Ag nanočástic byly použity válcové částice „divokého“ a rekombinovaného tabákového mosaikového viru. Chemickou redukcí  $(\text{PtCl}_6)^{2-}$  nebo  $(\text{AuCl}_4)^-$  komplexů v kyselé oblasti pH byly získány specifické dekorace vnějšího povrchu tyčinek viru nanočásticemi o rozměru menším než 10 nm<sup>152</sup>.

#### 4.3.9.7. Závěry

Biomimetické nanotechnologie jsou velkým příslibem pro udržení pokroku v oblastech jako jsou nanoelektronika, nanorobotika, nanomedicína ap. Jako klíčové se v současné době jeví následující problémy:

- Řízení rozměrů krystalických nebo aperiodických uspořádaných souborů
- Výroba 2D nanokrystalů delších než 1-2 mikrometry
- Výroba nanokrystalů téměř bez chyb. Aplikace v nanoelektronice vyžadují vysoký stupeň přesnosti, i když již byly předloženy způsoby, jak tolerovat chyby.
- Způsob přenosu sil v nanomechanických zařízeních. Mohou tato zařízení přenášet síly podobným způsobem jako větší zařízení v makroskopickém světě?
- Jak se vypořádáme s architekturou rozhraní mezi „vlhkými“ biomimetickými nanotechnologiemi a „suchou“ nanotechnologií uhlíkových nanotrubic a nanoelektronických komponent?

Vědci jsou přesvědčeni, že na tyto a další otázky znají odpověď.

Prozatím, i přes velmi intenzivní a rozsáhlou vědecko-výzkumnou činnost, jsou bionanotechnologie na počátku praktické realizace, až na některé výjimky (liposomy, proteinové sítě).

<sup>149</sup> Shimizu T. „A New Type of Nanotube Formed from Molecules“, [www.aist.go.jp/aist\\_e/aist\\_today/2003\\_10/nanotech2\\_03.html](http://www.aist.go.jp/aist_e/aist_today/2003_10/nanotech2_03.html); AIST Today, 2003, No. 10.

<sup>150</sup> Shimizu T. et al „Supramolecular Nanotube Architectures Based on Amphiphilic Molecules“, Chem. Rev., 105, 2005, str. 1401; Yu H. et al „Encapsulation of Ferritin within Hollow Cylinder of Glycolipids“, Chemistry Lett., 34, 2005, str. 232; Jung J.H. et al „Ultrastable Steroidal Nanotube Formed in Organic Solvents“, Chemistry Lett., 34, 2005, str. 532.

<sup>151</sup> Gardea-Torresday J.L. et al „Formation and Growth of Au Nanoparticles Inside Live Alfalfa Plants“, Nano Lett., 2, 2002, str.397.

<sup>152</sup> Dujardin J. et al „Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates“, Nano Lett., 3, 2003, str. 413.

## 5. NANOTECHNOLOGIE → BIOTECHNOLOGIE, BIOFARMACIE A MEDICÍNA

Pro aplikaci nanotechnologií v biotechnologiích a medicíně se v poslední době používají výrazy nanobiotechnologie a nanomedicína. **Nanobiotechnologie** se zabývají využitím nanomateriálů, zobrazovacích nanotechnologických metod a nanozařízení při zkoumání biologických systémů, v diagnostice, při vývoji nových léků a v dalších oblastech..

**Nanomedicína** je definována jako soubor věd a technologií využívaných pro diagnózu, terapii a prevenci chorob a traumatických poranění, utišení bolestí a pro ochranu a zlepšení lidského zdraví, používající molekulární nástroje a znalosti o lidském těle na molekulární úrovni<sup>153</sup>.

**Nanotechnologie** nabízejí nová řešení pro transformaci biosystémů a poskytují širokou technologickou základnu pro využití v několika oblastech:

- v průmyslovém biozpracování;
- v molekulární medicíně - nanomedicíně (odhalování a léčba chorob, nahrazování částí lidského těla, regenerativní medicína, nanometrická chirurgie, syntéza a cílená dodávka léků do organismu ap.);
- v biofarmacii při vývoji nových léků
- při zkoumání vlivu nanostruktur na zdraví a životní prostředí (vliv znečištění okolí nanočásticemi a ekotoxikologie);
- při zkvalitnění zemědělských systémů (předprogramovaná/samoregulační dodávka živin, transplantované buňky chráněné membránami, bioseparace, snímače signálu, rychlé odebírání vzorků a péče o zdraví chovných zvířat);
- v potravinářství (při zvyšování výkonů v zemědělství, u nových potravinářských výrobků, při konzervaci potravin, v obalové technice ap.)<sup>154</sup>;
- v lesnictví <sup>155</sup>;
- v budoucnosti při zlepšování kvality lidského výkonu (zvyšování smyslové kapacity, propojení mozku a mysli, integrování nervových systémů s nanoelektronikou a nanostrukturovanými materiály).

Nanotechnologie nabízejí pro biotechnologie, medicínu a další oblasti nové nástroje a přístroje zkoumání na molekulární úrovni, nové analytické postupy a především nové materiály zvláštních vlastností.

V této kapitole budou charakterizovány materiály a zobrazovací a analytické metody, jež nanotechnologie nabízejí pro využití v biologickém výzkumu. V dalších kapitolách bude pozornost zaměřena na možnosti uplatnění nanotechnologií ve farmacii a na rychle se rozvíjející odvětví nanobiotechnologie - nanomedicínu.

---

<sup>153</sup> „ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine“, European Science Foundation Policy Briefing, Feb. 23, 2005, [www.esf.org](http://www.esf.org)

<sup>154</sup> Joseph T., Morrison M. „Nanotechnology in Agriculture and Food“, 5/2006, [www.nanoforum.org](http://www.nanoforum.org).

<sup>155</sup> Jankovský L., Šmerda L. „Aplikace molekulární biologie v lesnictví – molekulární markery“, Lesnická práce, 82, 1/2003, str. 32.

## 5.1. MODERNÍ ZOBRAZOVACÍ A ANALYTICKÉ METODY A PŘÍSTROJE

V průběhu historického vývoje<sup>156</sup>, který započal v roce 1590 vynálezem mikroskopu, jehož základem byly čočky (Janssen), se v biologii a souvisejících vědách a technologiích<sup>3</sup> (**obr. č. 2**) rozvinula samostatná odvětví analytických biologických technik, laboratorní diagnostiky a zobrazovacích metod<sup>157</sup>. Několik dalších historických dat stojí za zaznamenání:

- 1663 – první popis buňky v korku (Hooke)
- 1675 – objev bakterie (Leeuwenhoek)
- 1830 – objeven protein
- 1833 – izolovány první enzymy
- 1855 – objevena bakterie *E.coli*
- 1868 – izolována DNA ve spermatu lososu (Miescher)
- 1877 – vyvinuta technika barvení a identifikace bakterií (Koch)
- 1878 – vyvinuta první odstředivka (Laval)
- 1917 – poprvé byl použit a definován výraz „biotechnologie“ (Ereki)
- 1922 - vynalezena ultrafiltrace (Zsigmondy)
- 1925 – položeny základy elektronové mikroskopie (interference elektronových paprsků - Elsasser)
- 1926 – vyvinuta první analytická ultraodstředivka (Svedberg)
- 1929 – zkonstruován encefalograf (Berger)
- 1932 – vynalezen elektronový mikroskop (Ruska, Knoll)
- 1933 – elektroforéza byla použita pro dělení proteinů v roztoku (Tiselius)
- 1934 – provedena první podrobná rgt. difrakce vzorků proteinů (Bernal, Cowfoot)
- 1938 – poprvé použit výraz „molekulární biologie“
- 1939 – viry poprvé fotografovány elektronovým mikroskopem (Kausch, Rusk)
- 1941 – poprvé použit výraz „genetické inženýrství“
- 1942 - vyvinuta chromatografie (Martin, Syngé)
- 1953 – popis dvojšroubovitové struktury DNA (časopis Nature – Watson, Crick)
- 1954 – vyvinuta technika pěstování kultur buněk
- 1957 – patentován konfokální mikroskop (Minsky). Jeho realizace se zdržela 30 let.
- 1965 – vyroben první skenovací elektronový mikroskop (Cambridge Instruments)**
- 1966 – objasněn genetický kód (Nirenberg, Ochoa, Khorana)
- 1967 – zkonstruován první sekvencér proteinů
- 1973 – byla vyvinuta technologie rekombinantní DNA (Boyer, Cohen)
- 1974 – patentováno využití nukleární magnetické rezonance (Damadian)
- 1975 – popsána a použita analytická metoda Southern blotting (Southern)
- 1977 – vyvinuty metody pro přesné stanovení sekvence nukleotidů v DNA (Sanger a nezávisle též Gilbert)
- 1978 – objev principu optické pinzety (Ashkin)
- 1981 – na trhu se objevily první komerční syntetizéry DNA
- 1984 – vyvinuta technika DNA otisků (fingerprinting)
- 1986 – zkonstruován mikroskop atomových sil (AFM – Binnig, Rohrer)**
- 1988 – poprvé použita polymerázová řetězová reakce (PCR – Mullis)
- 1989 – publikována první technika amplifikace RNA (firma 3SR)
- 1991 – první komerční diagnostické soupravy na základě PCR se objevují na trhu v Evropě

<sup>156</sup> „A Timeline of Biotechnology“, [www.bio.org/timeline.html](http://www.bio.org/timeline.html)

<sup>157</sup> Pavlík E., Chaloupecký V. „Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku“, 9. částí, [www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp](http://www.roche-diagnostics.cz/la/odborne.asp)  
Zíma T. et al „Laboratorní diagnostika“, vyd. Galén, 2002, ISBN 80-7262-201-3  
Vilček Š. „Molekulárno-genetické metody detekcie mikroorganizmov“, Vesmír, 74, 1995, str. 134.



1995 – popsáno použití DNA-mikrosouboru (Brown a spolupracovníci)

2000 - úspěšně ukončeny práce na rozluštění lidského genomu

Ve všech vědních disciplínách uvedených na **obr. č. 2** a v dalších souvisejících oblastech byla v průběhu doby vyvinuta velká řada nejrůznějších analytických, zobrazovacích, detekčních a diagnostických metod založených na různých fyzikálních, chemických a biologických principech, v posledních desetiletích i s využitím výpočetní a řídicí techniky. Neúplný obraz nám dává např. „Číselník procedur“ uveřejněný začátkem roku 2006 na stránkách Ministerstva zdravotnictví ČR, ve kterém je uvedeno přes 250 metod (17 procedur elektroforézy, 15 procedur chromatografie, 38 procedur kultivace buněk atd.)<sup>158</sup>.

V této kapitole budou velmi stručně charakterizovány jen nejdůležitější metody používané při výzkumu především v biochemii, cytologii a cyto genetice, molekulární biologii, imunologii, atd. a metody používané při vývoji léků a léčebné terapii.

Velká většina metod nesouvisí s nanotechnologiemi, ale při postupně rostoucím úsilí o uplatnění nanomateriálů a nanozařízení v některých metodách se již nanotechnologie uplatňují a nelze vyloučit, že jimi budou ovlivněny i doposud tradiční metody. Za produkty nanotechnologie lze považovat především metody mikroskopie skenující sondou.

Přehled metod je uveden v **Tab. č. V.**, přičemž metody, k jejichž rozvoji v současné době přispívají nebo mohou přispět nanotechnologie, jsou vyznačeny tučně.

**Tab. č. V.** Vybrané metody molekulárně-biologického zobrazování a analýzy

<b>Metoda</b>	<b>Druh zařízení</b>
Optické zobrazování a analýza	LSCM, TIRF, IRM, STED, TOF SIMS, RS, <b>SERS</b> , FLIM, <b>FRET</b> , FRAP, <b>SNOM</b> , <b>optická pinzeta</b> , <b>SPRM</b>
Elektronová mikroskopie	<b>SEM</b> , <b>TEM</b> , STEM, ESEM, LVEM, EELS, <b>ET</b>
Mikroskopie se skenující sondou (SPM)	<b>AFM</b> , <b>SICM</b> , SCM, SCPM, SThM
Nukleární zobrazování a rtg. diagnostika	CT, PET, SPECT, MRS, <b>MRI</b> , <b>rtg. mikroskopie</b> , <b>rtg. difraktometrie</b>
Molekulárně biologické techniky	<b>Hybridizace DNA a RNA</b> , PCR, restrikční analýzy, <b>mikrosoubory</b>
Biosenzory	<b>S nanonosníky</b> , <b>s nanotubicemi</b> , <b>s nanodráty</b> ,

### 5.1.1. OPTICKÉ ZOBRAZOVÁNÍ A ANALÝZA

Optické metody se používají především pro zobrazování a analýzu povrchů vzorků. Jedná se zejména o mikroskopii a spektroskopii. Fluorescenční označování biologických vzorků a fluorescenční mikroskop přinesl do biologického výzkumu nové prvky. Fluorescenční mikroskopie je již dlouhou dobu základním, prověřeným a univerzálním nástrojem studia živých buněk. Její vysoká citlivost, neinvazivnost a stále rostoucí spektrum sofistikovaných fluorescenčních indikátorů jí zajišťuje významnou roli při biologickém výzkumu i v budoucnosti. Nejdokonalším zařízením tohoto typu je v současné době konfokální laserový skenovací mikroskop (LSCM).

<sup>158</sup> <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz>

Nedostatkem světelné mikroskopie je však její základní omezení – dosažitelné rozměrové rozlišení dané zákony difrakce světla (poloviční vlnová délka, 250 - 300 nm). Vývoj fluorescenční mikroskopie však stále probíhá s cílem dosažení většího rozlišení (např. metoda STED). Ve fluorescenční mikroskopii se objevila řada značně specializovaných metod, jež umožňují získat věrohodnou informaci o fyzikálních vlastnostech blízkého okolí použité fluorescenční sondy (FLIM, FRET, TIRF, FRAP aj.)<sup>159</sup>. Bylo vyvinuto i několik moderních spektroskopických metod pro analýzu povrchů, které jsou dnes ve značném rozsahu používány (SERS, SERRS ap.). Fluorescenční mikroskop je koncovým zařízením mnoha molekulárně biologických metod (DNA mikrosoubory, imunologická metoda ELISA ap.). Některá zařízení dosáhla svojí rozlišovací schopností oblasti nanometrů a jejich používání v této oblasti patří do oblasti nanotechnologií (STED, FRET, TIRF, SNOM, optická pinzeta aj.).

### 5.1.1.1. Fluorescence

Fluorescence je jedním z typů luminiscence, kdy vhodné molekuly emitují světlo z elektronicky excitovaných stavů vytvořených buď fyzikálními (absorpce světla), mechanickými (tření) nebo chemickými mechanismy. Generace luminiscence excitací molekuly ultrafialovými fotony nebo fotony viditelného světla je jev nazývaný fotoluminiscence, který se formálně rozděluje na fluorescenci a fosforescenci, v závislosti na elektronové konfiguraci a době trvání excitovaného stavu (doba trvání: fluorescence:  $10^{-6}$  –  $10^{-9}$  s, fosforescence ( $10^{-6}$  –  $10^2$  s)). Fluorescence je vlastnost některých atomů a molekul absorbovat světlo při určité vlnové délce a následně je emitovat při delší vlnové délce po určitou dobu. K emisi světla dochází jen po dobu, kdy je buzena.

Hlavní charakteristiky fluorescence jsou:

1. **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
2. **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
3. **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
4. **doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
5. **koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln

#### 5.1.1.1.1. Fluorofory

Fluorofory (fluorescenční sondy) jsou části molekul, které způsobují, že molekuly světélkují. V určitých molekulách je funkční část, která absorbuje energii při určité vlnové délce a reemituje ji při jiné, stejně specifické vlnové délce. Objem a vlnová délka emitované energie závisí jak na vlastnostech fluoroforu, tak na jeho chemickém okolí.

Historie syntetických fluoroforů sahá až do posledních desetiletí 19. století, kdy byly již známy základní histologická barviva. Do fluorescenční mikroskopie byly fluorofory zavedeny v dvacátých letech minulého století jako barviva bakterií a postupně se začaly využívat. Urychlení vývoje nastalo v roce 1940, kdy Albert Coons vyvinul techniku pro značení protilátek fluorescenčními barvivy (vznikl obor imunofluorescence). Technologie fluorescenčních sond a buněčná biologie se výrazně změnila objevením zeleného fluorescenčního proteinu (**GFP**) v medúze a vývojem spektrálních variant jeho mutantů. To umožnilo rozvoj neinvazivního fluorescenčního mnohobarevného výzkumu polohy

<sup>159</sup> Plášek J. „Proměny světelné mikroskopie ve 20. století“, Vesmír, 83, 3/2004, str. 146.

subbuněčných proteinů, mezimolekulárních interakcí a dopravy v buňkách, a to při použití živých buněčných kultur. Teprve nedávno poskytl vývoj nanometrických fluorescenčních polovodičů (**kvantových teček**) nový impuls pro další rozvoj fluorescenční mikroskopie a jejich dalšího využití v biologii a medicíně. Zaznamenáno bylo rovněž požití nanočástic ZnO<sup>160</sup>.

Fluorescence se využívá v několika oblastech: ve fluorescenční mikroskopii<sup>161</sup>, ve světelné technice (zářivky, LED), mineralogii a zejména v biochemii a medicíně.

Nehledě na významný pokrok při syntéze fluoroforů v posledních desetiletích, existuje málo důkazů o molekulárních principech, o které by se mohl další rozvoj opřít, zejména v oblasti přizpůsobení absorpčních spekter fluoroforů ke konfokálním laserovým excitačním vlnovým délkám, které jsou k dispozici. Výsledkem je, že z mnoha tisíců objevených fluoroforů se jen malé množství používá v konfokální mikroskopii.

Fluorofory jsou katalogizovány a popisovány podle absorpčních a fluorescenčních vlastností, včetně spektrálních profilů, vlnových délek pro maximální absorpční a emisi a podle fluorescenční intenzitě emitovaného světla. Jeden z nejužitečnějších kvantitativních parametrů pro charakterizaci absorpčního spektra je molární extinkční koeficient  $\epsilon$  – viz **obr. č. 42a**, který je přímou mírou schopnosti molekuly absorbovat světlo. Jiným parametrem je **kvantový zisk** fluoroforu, který reprezentuje kvantitativní míru účinnosti fluorescenční emise a je vyjádřen jako poměr počtu fotonů emitovaných k počtu fotonů absorbovaných. Kvantový zisk nabývá hodnoty mezi 0 -1 a kvantový zisk molekul používaných jako sondy v mikroskopii je v rozsahu 0,05 až po téměř 1. Obecně, pro všechny druhy zobrazení je vhodný vysoký kvantový zisk. V mnoha případech je molární extinkční koeficient pro absorpci fotonů kvantitativně měřen při specifické vlnové délce, zatím co kvantová účinnost je stanovení celkové integrální emise fotonů v celém spektrálním pásu fluoroforu – **obr. č. 42b**.

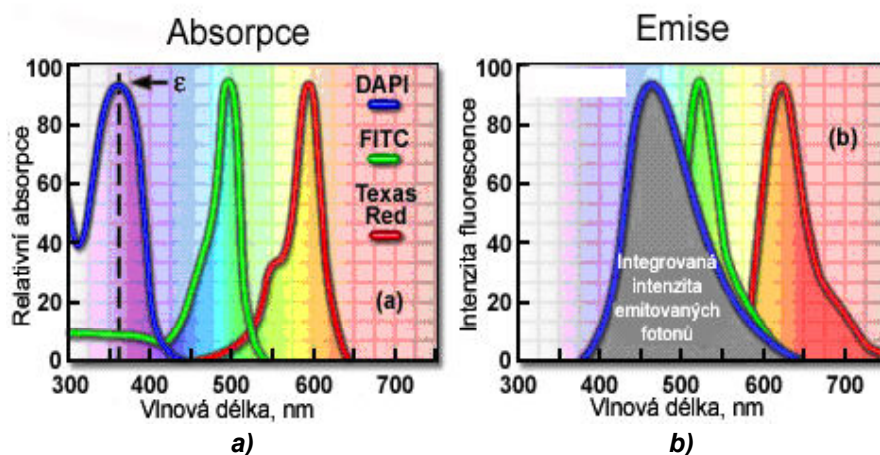
V současné době se používají následující skupiny fluoroforů:

- Tradiční fluorofory (Izothiolcyan fluoresceinu, texasská červeň, TMR – tetrametyl rhodamin, akridinová barviva aj.)
- Fluorová barviva Alexa (Alexa Fluor 350, 406, 488 aj.)
- Cyaninová barviva (Cy2, Cy3, Cy5, Cy7 aj.)
- Fluorescenční sondy pro prostředí buněk ( EGTA, BAPTA, Fura Red aj.)
- Organelové sondy (BODIPY, DiOC(6) aj.)
- Kvantové tečky (CdSe různých rozměrů)
- Fluorescenční proteiny (GFP a derivativy – EGFP, BFP, CFP, YFP; mRFP1, dsRED, kFP1 aj.)<sup>162</sup>

<sup>160</sup> Dorfman A, Kumar N, Hahn Jong-in „Highly Sensitive Biomolecular Fluorescence Detection Using Nanoscale ZnO Platforms“, Langmuir, 22, 2006, str. 4890.

<sup>161</sup> [www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html](http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html)

<sup>162</sup> Zhang J. et al „Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology“, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2, 2002, str. 906.



Obr. č. 42 Spektrální profily populárních a tradičních fluoroforů

### 5.1.1.2. Biologická laserová skenovací konfokální fluorescenční mikroskopie a spektroskopie

Biologická laserová skenovací konfokální fluorescenční mikroskopie a spektroskopie velmi závisí na intenzitě fluorescence označeného biologického vzorku. Mnoho fluorescenčních sond je konstruováno kolem syntetických aromatických organických chemikálií s cílem jejich vazby na biologické makromolekuly (proteiny, DNA) nebo s cílem jejich umístění ve specifických organelách v buňce, jako jsou cytoskelet, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a jádro. Jiné sondy se používají pro monitorování dynamických procesů a místních změn prostředí, včetně koncentrace anorganických kovových iontů, pH, membránového potenciálu ap. Fluorescenční barviva jsou užitečná rovněž pro monitorování buněčné integrity (např. studium zániku buňky rozdělením na několik částí – apoptóza), endocytózy, exocytózy, tekutosti membrán, dopravy proteinů a aktivity enzymů. Fluorescenční sondy byly rovněž úspěšně použity při mapování genomů a analýze chromozomů.

V průběhu doby byly vyvinuty různé varianty laserové skenovací konfokální mikroskopie a spektroskopie, z nichž ty nejdůležitější budou stručně charakterizovány.

**LSCM** (Laser Scanning Confocal Microscope) – laserový skenovací konfokální mikroskop<sup>163</sup>. Při konfokální<sup>164</sup> mikroskopii se pozorovaný objekt zobrazuje postupným ozařováním jeho jednotlivých bodů zaostřeným paprskem světla. V případě LSCM je zdrojem světla laser a mikroskopický obraz objektu vytváří počítač na základě fluorescence měřené bod po bodu. V poslední době byl LSCM vybaven mřížkovými spektrometry<sup>165</sup>. Jsou vhodné pro odlišení barev ve vícenásobně zbarvených buňkách.

<sup>163</sup> Reischig J. „Konfokální fluorescenční mikroskop“, Vesmír, 74, 1995, str. 482.

Kubínová L. „Konfokální a dvoufotonová mikroskopie“, Vesmír, 83, 3/2004, příloha „Mikroskopie dnes“, str. M4.

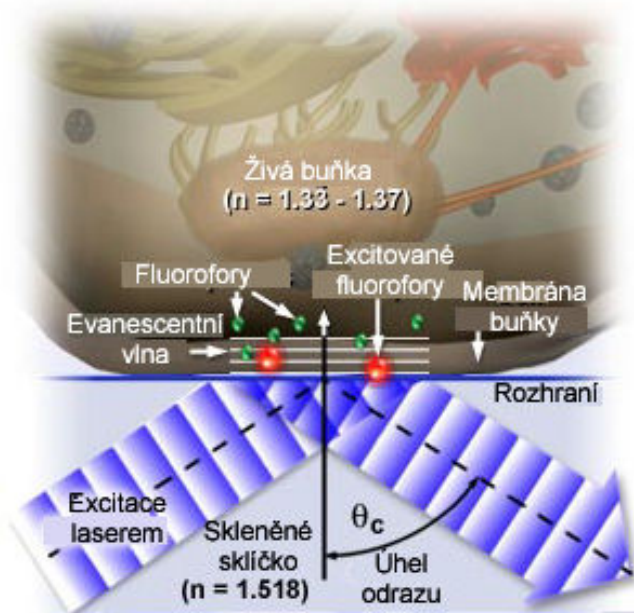
Plášek J. „Víc než pouhý mikroskop“, Vesmír, 83, 2004, str.586.

<sup>164</sup> **Konfokální** – je to, co je sdružené s ohniskem (konjugovaný + fokální). V daném případě je to ohnisko objektivu, které je sdruženo s dírkovou clonou před detektorem.

<sup>165</sup> www.olympus.cz

**STED** (Stimulated Emission Depletion Microscopy) – je fluorescenční mikroskopie překonávající difrakční bariéru<sup>166</sup>. Je to rozvíjející se technika, která umožňuje dosažení axiální rozlišitelnosti pod 50 nm. Metoda závisí na tlumení fluorescence excitovaných molekul na okraji stopy skenujícího laseru použitím synchronizovaných laserových pulzů pro excitaci fluoroforů a rozměrově koordinovaných STED pulzů pro ochuzení emise. Výsledná fluorescence je tlumena na okraji stopy, ale nikoliv v jejím středu, což velmi výrazně zmenšuje velikost fluorescenční stopy a zvyšuje rozlišitelnost metody.

**TIRFM** (Total Internal Reflection Fluorescence Microscope) - je fluorescenční mikroskopie, využívající unikátních vlastností indukované evanescentní vlny selektivně osvětlovat a excitovat fluorofory v omezené oblasti vzorku těsně přiléhající k rozhraní sklo-voda nebo sklo-tlumicí roztok.. Rozdíly v indexech lomu skla a vody určují, jak se světlo, v závislosti na úhlu dopadu na rozhraní, lomí nebo odráží. Při určitém kritickém úhlu je světelný paprsek od rozhraní sklo/voda totálně odražen a jeho lom probíhá podle Snellova zákona. Odraz generuje ve vodním prostředí velmi tenké elektromagnetické pole (obvykle o tloušťce pod 200 nm), které má stejnou frekvenci jako dopadající světlo. Toto pole nazývané evanescentní vlna se s rostoucí vzdáleností od povrchu exponenciálně zeslabuje.



**Obr. č. 43** Schematické znázornění koncepce TIRF

Na **obr. č. 43** je schematicky znázorněna koncepce TIRF ukazující selektivní excitaci fluoroforů v tkáňové buňce (index lomu  $n = 1,33 - 1,37$ ) přiléhající na povrchu sklíčka (index lomu  $n = 1,518$ ). Vlnová fronta z modrého laseru prochází sklem a je odrazena z hranice sklo-tlumicí roztok při kritickém úhlu, za vzniku evanescentní vlny putující několik stovek nanometrů do buněčné membrány. Fluorofory v membráně (o tloušťce cca 7-8 nm), nacházející se těsně u skleněného rozhraní (malé zelené kuličky), jsou excitovány evanescentní vlnou a následně emitují sekundární fluorescenci (červeně). Fluorofory nacházející se ve větší vzdálenosti od skleněného rozhraní nejsou excitovány<sup>167</sup>. Metoda umožňuje různá zkoumání na živých buňkách v tekutém prostředí.

<sup>166</sup> Weiss S. „Shattering the Diffraction Limit of Light: A Revolution in Fluorescence Microscopy?“, PNAS, 97, 2000, str. 8747. Klar T.A. et al „Fluorescence Microscopy with Diffraction Resolution Barrier Broken by Stimulated Emission“, PNAS, 97, 2000, str. 8206.

<sup>167</sup> [www.olympusmikro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html](http://www.olympusmikro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html)

**FRET** (Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer). Typická fluorescenční mikroskopie závisí na absorpci světla jedné vlnové délky fluoroforem (excitace) a následující emisí sekundární fluorescence na delší vlnové délce. Excitační a emisní vlnové délky bývají od sebe odděleny ve světelném spektru vzdálenostmi o velikosti desítek až stovek nm. Při současném označení jednotlivých pozorovaných biologických subjektů fluorofory s oddělenými excitačními a emisními spektry lze použít speciální kombinace fluorescenčních filtrů a zkoumat blízkost (vzdálenost) označených molekul v jednotlivé buňce nebo řezu tkáně. Při této technice molekuly, které jsou u sebe blíže než je optická mez rozlišitelnosti, se jeví jako shodné a v mnoha případech nelze rozhodnout, zda došlo k interakci molekul. Řešení tohoto problému umožňuje **FRET**. Je to fyzikální jev - nezářivý přenos excitační energie jako důsledek interakce mezi elektrickými dipóly dvou fluorochromů (donorem a akceptorem). Přenos energie je omezen na vzdálenost přibližně 10 nm. Jeho účinnost je extrémně citlivá ke vzdálenosti fluoroforů a lze ji stanovit podle vzorce  $FRET_{ef} = I_A / (I_A + I_B)$ , kde  $I_A$  je intenzita fluorescence akceptoru a  $I_B$  je intenzita donoru. Technika má zásadní význam při sledování molekulárních interakcí a mezimolekulárních vzdáleností s nanometrickou přesností<sup>168</sup>.

FRET byl použit nebo se používá v řadě aplikací biomolekulárního výzkumu, např.

- Při analýze struktury a konformace proteinů,
- Při zkoumání interakcí receptor - ligand,
- Při zkoumání struktury a konformace nukleových kyselin,
- Při detekci hybridizace nukleových kyselin,
- Při zkoumání rozdělení a transportu lipidů v membránách,

a v mnoha dalších aplikacích<sup>169</sup>.

**FRAP** (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Touto metodou mohou být stanoveny laterální difúzní koeficienty fluorescenčně označených makromolekul (např. proteinů v membráně) a malých fluoroforů. Intenzivnímu osvětlení laserem je podrobena velmi malá vybraná oblast (o průměru několika mikrometrů), což má za následek úplné vyhasnutí fluoroforů v oblasti. Po (foto)vyhasnutí se monitoruje rychlost a rozsah obnovení fluorescenční intenzity v oblasti jako funkce času potřebného pro regeneraci populace fluoroforů a kinetika obnovy. Metoda se obvykle používá se zeleným fluorescenčním proteinem<sup>170</sup> (GFP) při spojování proteinů, kdy studovaný protein je zábleskem laseru spojen s GFP.

**FLIM** (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) – je sofistikovaná technika umožňující současný záznam jak doby fluorescence, tak rozmístění fluoroforů na každém místě zkoumaného vzorku. Metoda poskytuje možnost zkoumání environmentálních parametrů, jako např. pH, koncentrace iontů, polarita rozpouštědel a tlaku kyslíku v živých buňkách. Doba vyhasínání se měří v nanosekundách a je nezávislá na místní koncentraci fluoroforu, artefaktech spojených s (foto)vyhasnutím a tloušťce vzorku. Je však citlivá na reakcích v excitovaném stavu (např. rezonančním přenosu energie). Metoda omezuje vliv rozptylu fotonů v tlustostěnných vzorcích. Je proto velmi užitečná při zobrazování tkání, protože umožňuje pozorování tlustších vzorků.

**FCS** (Fluorescence Correlation Spectroscopy). Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je technika při níž jsou měřeny spontánní fluktuace intenzity fluorescence v mikroskopickém objemu (kolem  $10^{-15}$  l) určeném fokusovaným excitačním laserovým paprskem. Při FCS se fokusovaným laserovým paprskem ozáří malý objem vzorku (obvykle jeden femtolitr) a

<sup>168</sup> Bednár J. et al „Dnešní mikroskopie v biomedicině“, Vesmír, 83, 2004, str. 581.

<sup>169</sup> <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/0422.html>.

<sup>170</sup> **GFP** je populární zelený fluorescenční protein izolovaný z medúzy (*Aequorea victoria*)

zaznamenávají se spontánní fluktuace fluorescenční intenzity, které jsou důsledkem počtu molekul v daném objemu v daném čase. Poměrně malé fluorofory rychle difundují osvětlenou oblastí, přičemž generují krátké nahodilé záblesky. Na rozdíl, velké komplexy (fluorofory spojené s makromolekulami) se pohybují mnohem pomaleji a vytvářejí delší a trvalejší časově závislé stopy intenzity. Časová závislost intenzity fluorescence je potom analyzována pomocí dočasné autokorelační funkce, která obsahuje informaci o rovnovážných koncentracích, reakčních kinetikách a difúzních rychlostech molekul ve vzorku.

Mezi aplikace fluorescenční korelační spektroskopie patří:

- fragmentace nukleových kyselin
- hybridizace nukleových kyselin
- tvorba produktů PCR
- laterální oddělení lipidů v dvojvrstvách
- difúze molekul v jádře a cytoplazmě
- interakce protein-protein
- vazebná rovnováha pro léčiva a jiné ligandy
- shlukování (clustering) membránových receptorů

Metoda se užívá především ve spojení laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem nebo multifotonovým mikroskopem.

### 5.1.1.3. Fluorescenční infračervená spektroskopie

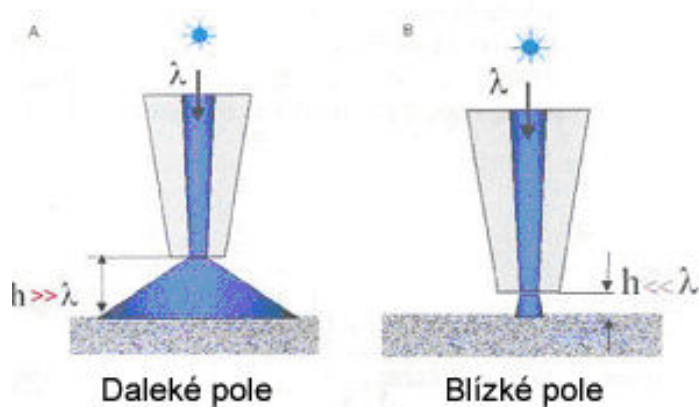
**FT-IR** (Fluorescence/Fourier Transform Infrared Spectroscopy) – je analytická technika používaná pro identifikaci především organických materiálů. Měří se absorpce infračerveného záření v materiálu při různých vlnových délkách. Může být prováděna ve vodním roztoku, organických rozpouštědlech, na tenkých filmech, povlacích atd. Používají se jen  $\mu\text{g}$  množství vzorku. Technikou se studovaly lipidové membrány, uhlohydráty, makromolekulární struktura a složení tkání, celé buňky a bakterie. Jako světelného zdroje se používá i synchrotronového záření, což značně zvětšilo možnosti metody, např. rozlišitelnost se zlepšila pod difrakční mez světla<sup>171</sup>.

**NIRS** (Near Infrared Spectroscopy) je spektroskopická metoda využívající oblast elektromagnetického spektra v blízkosti jeho infračervené části (od asi 1000 nm do 2500 nm). Jako širokopásmových zdrojů záření se používají žhavené nebo křemenné halogenové lampy. Používají se i LED. Metoda není příliš citlivá, ale použité záření proniká hlouběji než záření ze středního infračerveného pásma, což umožňuje zkoumat hmotné vzorky bez jejich velké přípravy. Vyhodnocení výsledků je obtížné. Metoda se používá při kontrole kvality léků, potravin a zemědělských výrobků, ale byla použita i při zobrazení hemodynamiky lidského mozku

### 5.1.1.4. Mikroskopie v blízkém optickém poli (SNOM)

Mikroskopy SNOM (Scanning Near-field Optical Microscope) umožňují zkoumat optické vlastnosti povrchu vzorku s rozlišením, které je lepší než vlnová délka světla. Osvětlením vzorků v blízkém viditelném světle dosáhneme překročení difrakční bariéry a tudíž rozlišení překračující možnosti optických mikroskopů pracujících s dalekým polem. Princip zobrazování v dalekém a blízkém poli je zřejmý z **obr. č. 44**.

<sup>171</sup> McNaughton D. „Synchrotron Infrared Spectroscopy in Biology and Biochemistry“, Australian Biochemist, 36, 2005, str. 55.

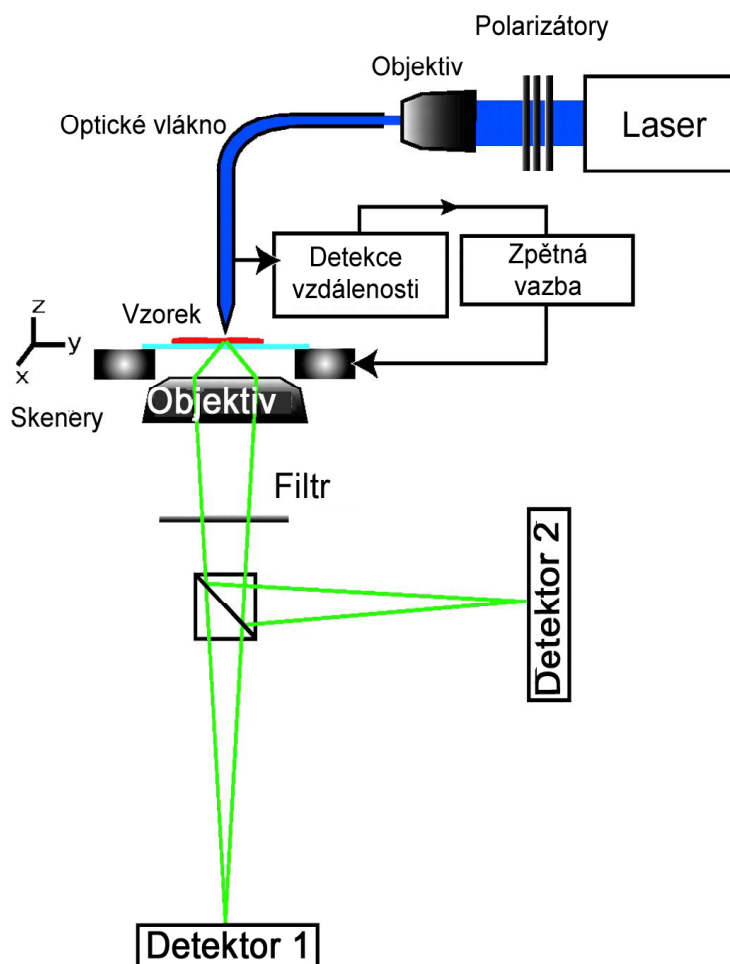


**Obr. č. 44** Porovnání zobrazení v dalekém a blízkém poli

Při zobrazení v dalekém poli je zdroj světla nebo světlo sdružující prvek vzdálen od vzorku ve vzdálenosti  $h \gg \lambda$  ( $\lambda$  je vlnová délka světla použitého pro osvětlení vzorku). Světlo je difraktováno tak, že osvětlená plocha je mnohonásobně větší než plocha apertury. Všechny detaily o rozměrech menších než je vlnová délka nejsou viditelné.

Při zobrazení v blízkém poli je optické zařízení vzdáleno od vzorku ve vzdálenosti  $h \ll \lambda$ . Osvětlená plocha přibližně odpovídá ploše apertury optického zařízení. Používají se sondy s aperturou o průměru několik nm. Výroba těchto sond je jedním z problémů této metody.

Schéma mikroskopu pracujícího v blízkém poli je uvedeno na **obr. č. 45**. Sondou je zašpičatělé optické vlákno – **obr. č. 46**. Světlo laseru je soustředěno do optického vlákna a je využito pro excitaci fluoroforů při skenování povrchu vzorku. Vzdálenost sonda – vzorek je během skenování udržována na konstantní hodnotě menší než 10 nm. Fluorescence vznikající na vzorku je snímána konvenčním invertním mikroskopem.

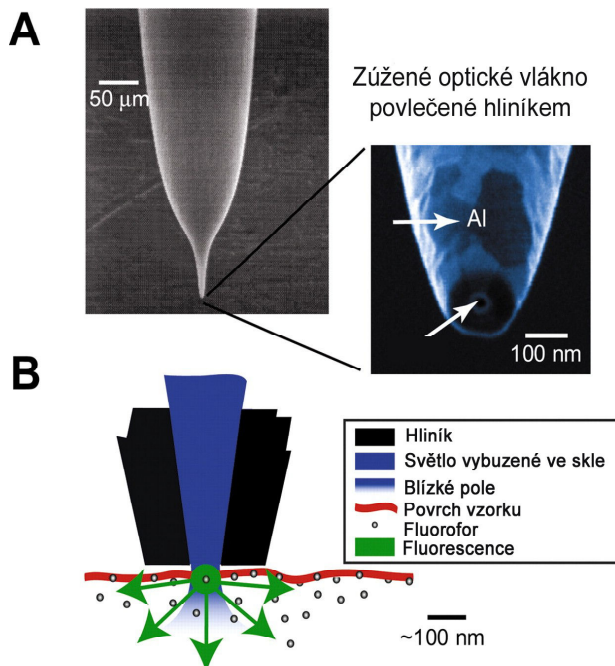


**Obr. č. 45** Schéma mikroskopu pracujícího v blízkém poli (SNOM)



Dvoukanálová optická detekce umožňuje rozlišení vlnové délky a/nebo polarizace světla. Na **obr. č. 46** se nacházejí různé informace o sondě<sup>172</sup>:

A. Optické vlákno je protaženo do konečného průměru 20 – 120 nm a povlečeno hliníkem. Povlak slouží k omezení světla do oblasti hrotu sondy. Apertura slouží jako miniaturní zdroj světla a její průměr rozhodujícím způsobem určuje optické rozlišení mikroskopu.



B. Princip specifické excitace povrchu: optické blízké pole generované aperturou má významnou intenzitu jen ve vrstvě méně než 100 nm od apertury, níže položené fluorofory nejsou proto excitovány. Zpětná fluorescence je účinně potlačena. To vytváří podmínky pro vysokou optickou detekční citlivost této metody.

**Obr. č. 46** Optická sonda blízkého pole

Stejně jako u metody AFM, i při metodě SNOM se vytváří topografická mapa povrchu vzorku. U SNOM je však unikátní, že současně se vytváří i odpovídající fluorescenční mapa povrchu. Jako první použili SNOM pro zkoumání fluorescence jedné molekuly ve fibroblastu (vazivová buňka) myši E. Betzig a R.J. Chichester v roce 1993<sup>173</sup>. Od té doby se používání SNOM postupně rozvíjí. Studují se především izolované systémy, např. chromosomy, DNA a fluorescenční proteiny, ale i detekce receptorů na nádorových buňkách<sup>174</sup>.

Aby SNOM mohl ve větší míře konkurovat fluorescenčním mikroskopům, jejichž zlepšování dále probíhá; je zapotřebí zkonstruovat SNOM, který by pracoval ve fyziologicky relevantních podmínkách a dovoloval studium měkkých, drsných a pohyblivých se povrchů jako jsou např. plasmatické membrány živých buněk<sup>175</sup>.

### 5.1.1.5. Optické pinzety (optical tweezers)

Dalším nástrojem, který se s velkým úspěchem používá v oblasti biofyziky za účelem provádění nanomechanických měření na makromolekulách a jejich seskupeních, jsou optické pinzety. První popis optické pinzety předložili v roce 1986 A. Ashkin et al<sup>176</sup>. Optická pinzeta je zařízení, které využívá mechanického účinku fokusovaného laserového svazku k prostorovému zachycení a přemísťování průsvitných mikroobjektů a nanoobjektů. Základní schéma je znázorněno na **obr. č. 47**. Laserový paprsek je fokusován velmi kvalitním

<sup>172</sup> de Lange F. et al: „Cell Biology Beyond the Diffraction Limit: Near-field Scanning Optical Microscopy“, Journal of Cell Science, 114, 2001, str. 4153

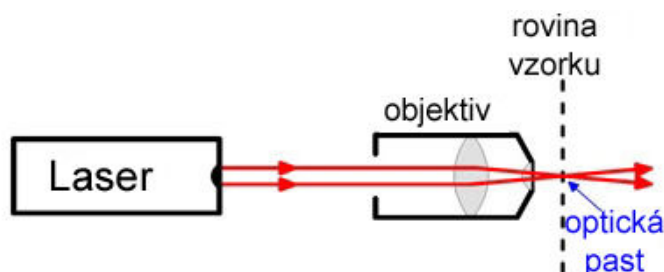
<sup>173</sup> Betzig E., Chichester R.J.: „Single Molecules Observed by Near-field Scanning Optical Microscopy“, Science, 262, 1993, str. 1422

<sup>174</sup> Nagy P. et al: „Activation-dependent Clustering of the erbB2 Receptor Tyrosine Kinase Detected by Scanning Near-field Optical Microscopy“, Journal of Cell Science, 112, 1999, str. 1733

<sup>175</sup> Plasmatická membrána tvoří obal živé buňky.

<sup>176</sup> Ashkin A. et al „Observation of a Single-beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles“, Optical Letters, 11, 1986, str. 288.

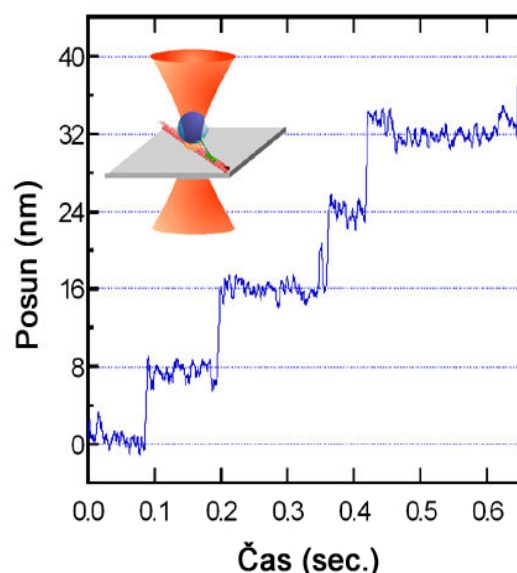
objektivem mikroskopu do stopy v rovině vzorku. Stopa vytváří „optickou past“, která je schopna tlakem laserového paprsku udržet malou částici ve svém středu. Základní princip činnosti optické pinzety spočívá v přenosu hybné síly (hybnosti) spojeném s ohybem světla. Světlo přenáší hybnou sílu úměrnou své energii a směru šíření. Jakákoliv změna ve směru světla, ať již odrazem nebo lomem, má za následek změnu hybnosti světla. Ohýbá-li předmět světlo a hybnost se mění, zachování hybnosti vyžaduje, aby předmět provedl stejně velkou opačnou změnu hybnosti. Tím vzniká síla působící na předmět.



**Obr. č. 47** Základní schéma činnosti optické pinzety

Zatímco AFM (viz dále) je relativně tuhé zařízení a používá velké síly (řádově ve 100 - 1000 pN), jsou optické pinzety měkké a měří menší síly (v řádu 0,1 - 10 pN). Radiační tlak fokusovaného laserového paprsku je schopen zachytit malé částice. V biologických vědách se zařízení používá pro aplikování sil v oboru pN a pro měření vzdáleností a rozměrů objektů v rozsahu od 10 - 100 nm. Možnosti mikromanipulace částicemi optickými pinzetami popsali nedávno K. Dholakia a P. Reece<sup>177</sup>.

Některé z nejzajímavějších experimentů, které byly s optickými pinzetami provedeny, se týkají fungování molekulárních motorů. Například byl připojen kinesin k opticky zachycené kapce a pozorován její pohyb po délce mikrotubulu. Bylo zjištěno, že kinesin se pohybuje v krocích o délce cca 8 nm – **obr. č. 48**<sup>178</sup>.



**Obr. č. 48** Výsledek měření pohybu kinesinu podél mikrotubuly

Podobné experimenty rovněž umožnily prozkoumat účinek změny koncentrace ATP na fungování kinesinu. Jiné pokusy byly provedeny s polymerázou RNA, která postupuje podél DNA, s cílem zjistit nejen velikost síly, vlivem které polymeráza přestává pracovat, ale rovněž i její rychlost jako funkci vynucené síly.

Taková měření poskytují mechanicko - chemickou základnu pro vysvětlení biologických funkcí a dalekosáhle odhalují spojení mezi chemickou kinetikou a mechanickými procesy na molekulární úrovni. Jedním z nejvíce fascinujících příkladů rozhraní biologie a nanotechnologie jsou bakteriální viry, známé pod názvem bakteriofágy. Životní cyklus rozsáhlé skupiny bakteriofágů je charakterizován procesy samoorganizace, které vedou k

<sup>177</sup> Dholakia K., Reece P. „Optical Micromanipulation Takes Hold“, Nanotoday, 1, 2006, str. 18.

<sup>178</sup> „Optical Tweezers: An Introduction“, [www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm](http://www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm)

vytvoření proteinového obalu viru, po kterém následuje aktivní zabalení virové DNA, které vykonává motor uvnitř tohoto obalu. Struktura tohoto tak zvaného „virového portálového motoru“ byla nedávno rozluštěna za pomoci rentgenové krystalografie. Optická pinzeta byla rovněž použita ke zkoumání charakteristických znaků procesu sbalování DNA u phi29 bakteriofágu. Jeden ze závěrů tohoto experimentu byl, že když je natěsnáno uvnitř kapsidu stále více DNA, motor musí působit proti stále narůstající odporové síle. Z kvantitativního hlediska tento pokus ukazuje sílu a míru natěsnění jako funkci frakce zabaleného genomu. Je rovněž důležité poznamenat, že bakteriofágy nejsou jen neznámým subjektem seriózního bádání, ale představují také základ pro obrovskou škálu produktů klonování, které se používají pro provádění experimentů s rekombinacemi DNA a celkově i s viry, s nimiž je prováděn výzkum, jenž je základem genové terapie.

#### 5.1.1.6. Povrchová plasmonová rezonance

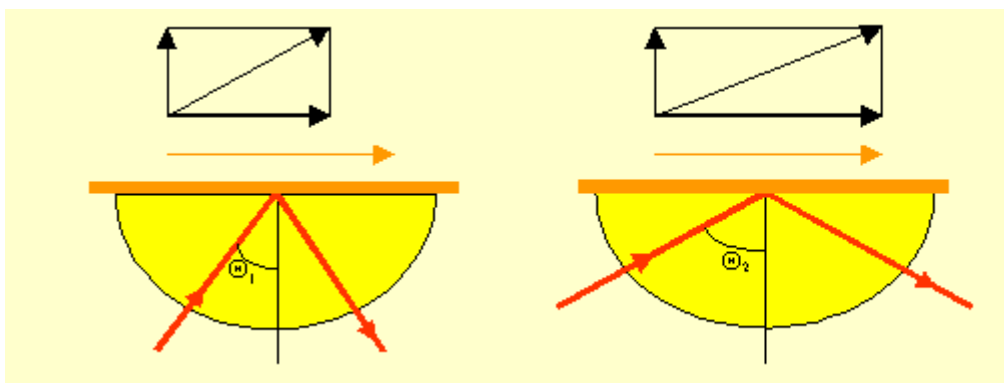
Povrchový plasmon je kvazičástice. Je to kolektivní excitace volných elektronů na mezifázi vodiče a izolátoru. S jevem povrchových plasmonů se můžeme setkat v řadě případů, např. při energetické ztrátě elektronů procházejících přes tenkou kovovou fólii, při pozorování barevných jevů v suspenzi malých kovových částic nebo při pozorování poklesu intenzity světla odraženého od pokovených difrakčních mřížek ap. Povrchové plasmony v rovině povrchu jsou neradiační elektromagnetické projevy, t.zn., že nemohou být vyvolány přímo světlem, ani se nemohou spontánně rozpadat na fotony. Příčina neradiační podstaty povrchových plasmonů spočívá v interakci světla s kovovým povrchem. Povrchové plasmony nemohou současně zajistit zachování energie a hybnosti. Toto omezení může být překonáno zdrsňením nebo drážkováním kovového povrchu nebo zvětšením efektivního vlnového vektoru světla použitím hranolu pro soustředění povrchových vln. Plasmony vytvářejí pole, které se šíří mediem na odvrácené straně povrchového filmu. Toto pole se nazývá evanescentní vlna, protože její amplituda klesá exponenciálně s rostoucí vzdáleností od povrchu.

Povrchová plasmonová rezonance nastává, když světlo polarizované v rovině dosáhne kovového filmu za podmínky totální vnitřní reflexe, tj. když světlo pronikající hranolem půlkruhového průřezu se odrazí od jeho rovného povrchu zpět do hranolu – **obr. č. 49**. Přitom hybnost dopadajícího světla se rovná hybnosti plasmonů (rezonance hybnosti). Hybnost fotonů a plasmonů lze popsat vektorovou funkcí s daným směrem a velikostí. Relativní velikost složek se mění se změnou úhlu dopadu (viz obr 49) nebo vlnovou délkou dopadajícího světla. Plasmony jsou však omezeny do roviny např. zlatého filmu, takže povrchová plasmonová rezonance má pouze složku vektoru paralelního s povrchem. Tloušťka filmu bývá obvykle cca 50 nm. Povrchová plasmonová rezonance závisí hlavně na vlastnostech kovového filmu, vlnové délce dopadajícího světla a indexu lomu média na obou stranách kovového filmu.

Zařízení využívající povrchovou plasmonovou rezonanci (jsou komerčně dostupná) mají v oblasti biologie řadu využití. Připojení biomolekul k povrchu filmu má za následek změnu indexu lomu, který se měří jako změna rezonančního úhlu nebo rezonanční vlnové délky. Ukázalo se, že změna indexu lomu na povrchu je lineární k objemu připojených molekul<sup>179</sup>.

Používají se senzory založené na biospecifické interakci - detekce choriogonadotropinu (hCG - indikátor těhotenství) nebo hepatitis B antigenu, senzory pro studium interakcí v systému antigen-protilátka, enzym-substrát, protein – protein, DNA – DNA, DNA – protein ap., pro studium reakcí probíhajících při srážení krve (fibrinogen, fibrin).

<sup>179</sup> Quinn J.G. et al „Development and Application of Surface Plasmon Resonance-based Biosensors for the Cell-ligand Interaction“, Analytical Biochemistry, 281, 2000, str. 135.



**Obr. č. 49** Schéma povrchové plasmonové rezonance

Princip povrchové plasmonové rezonance se dále využívá v SNOM, ve FTIR mikroskopii a sestaven byl i fluorescenční mikroskop dalekého pole s nanometrickou rozlišitelností (lepší než 60 nm při vlnové délce světla 515 nm), zvětšenou povrchovými plasmony<sup>180</sup>. Oblast vědy využívající jevu povrchové plasmonové rezonance se v poslední době nazývá plasmonika<sup>181</sup>.

#### 5.1.1.7. Ramanova spektroskopie

**RS** (Raman Spectroscopy) – Ramanova spektroskopie – je spektroskopická technika používaná ve fyzice pevné fáze a chemii pro studium vibračních, rotačních a jiných nízkofrekvenčních vlastností systémů. Spočívá v neelastickém (Ramanově) rozptylu monochromatického světla, obvykle laserového, ve viditelné, blízko infračervené a ultravioletové části spektra. Ramanův jev nastává, když světlo dopadne na molekulu a interaguje s polem elektronů vazaným k molekule. Velikost deformace tohoto pole určuje polarizovatelnost molekuly. Velikost polarizovatelnosti vazeb v molekule určuje intenzitu a frekvenci Ramanova posunu ve spektru. Z něho lze usuzovat na chemické vazby v molekule. Nedostatkem metody je malá citlivost, a proto se hledaly a hledají cesty k zesílení signálu. Používají se Ramanovy analyzátoři plynů, např. v medicíně pro monitorování anestetických a respiračních plynových směsí během operace v reálném čase. Byl zkonstruován konfokální Ramanův mikroskop s konfokální štěrbinou omezující objem světla přicházejícího z malé oblasti vzorku.

**SERS** (Surface Enhanced Raman Scattering) – metoda přinesla velké zlepšení RS tím, že na zkoumaný povrch jsou nanášeny vhodné molekuly nebo nanočástice kovů (např. Ag). Zesílení Ramanových signálů je řádu  $10^4 - 10^6$ , v některých systémech může být i větší. Zlepšení citlivosti metody souvisí s tím, že u molekul v blízkosti Ag nebo Au nanočástic se projevuje povrchová plasmonová rezonance. Toto vysvětlení není však jediné<sup>182</sup>.

#### 5.1.2. ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE A ANALÝZA

Pevné místo v biologickém výzkumu mají moderní elektronové mikroskopy (TEM – transmisní elektronový mikroskop, SEM – skenovací elektronový mikroskop). Z nových analytických metod, které se v současné době používají při zkoumání v bionanotechnologii a

<sup>180</sup> Smolyaninov I.I. et al „Far-field Optical Microscopy with a Nanometer-scale Resolution Based on the In-plane Image Magnification by Surface Plasmon Polaritons“, Phys.Rev.Lett., 94, 2005, str. 57401.

<sup>181</sup> Maier S.A. et al „Plasmonics – A Route to Nanoscale Optical Devices“, Advanced Materials, 13, 2001, str. 1501.

<sup>182</sup> Moskovits M. „Surface-enhanced Raman Spectroscopy: A Brief Retrospective“, Journal of Raman Spectroscopy, 36, 2005, str. 485.

nanomedicíně lze uvést především metody mikroskopie skenující sondou (Scanning Probe Microscope – SPM). Všechny SPM metody jsou založeny na znázorňování povrchu zkoumaných materiálů skenující sondou (obvykle raménko s hrotem nebo kapilára). Tyto mikroskopy nemají čočky. Původní skenovací tunelovací mikroskop<sup>183</sup> vytvářel poprvé obraz povrchu s rozlišením na atomární úrovni. Z něj se vyvinula řada přístrojů vhodných pro studium různých typů a vlastností povrchů. Objev mikroskopu atomových sil v roce 1986 a jeho použití při studiu biologických vzorků ve vodním prostředí v roce 1989<sup>184</sup> umožnilo poprvé zkoumání živých buněk a jednotlivých molekul.

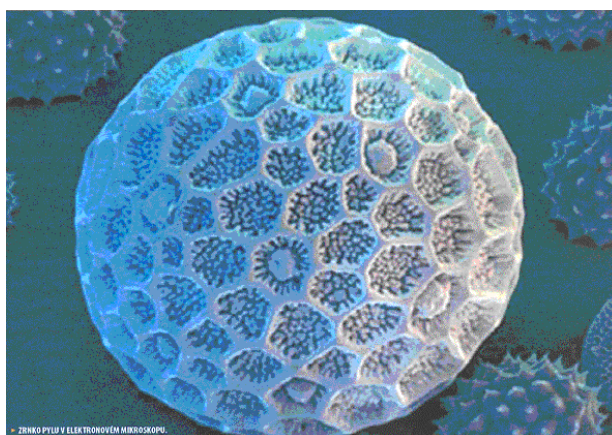
Skenovací a transmisní elektronový mikroskop (SEM, TEM) byly od svého počátku používány pro výzkum biologických objektů, přestože biologické vzorky nejsou pro tento způsob zobrazování příliš vhodné, protože mají obvykle vysoký obsah vody a v jejich hmotě převažují lehké atomy. Proto se musí biologické vzorky zbavovat vody a přidávají se do nich atomy těžkých kovů<sup>185</sup>. V současné době se rozvoj v biologické elektronové mikroskopii zaměřuje na hledání možností, jak pozorovat biologické vzorky v přirozeném stavu.

### 5.1.2.1 SEM

SEM (Scanning Electron Microscope) umožňuje zobrazení povrchu struktur. Vzorek se pokryje velmi tenkou vrstvou kovu a skenuje se svazkem elektronů, který je na vzorek zaostřen. Probíhá detekce jak rozptýlených, tak ze vzorku vyražených elektronů. Z těchto signálů se rekonstruuje obraz povrchu vzorku. SEM pracuje s vysokým vakuem, aby se zabránilo vlivu atmosféry na primární a sekundární elektrony. Ilustrativní obrázek zrnka pylu je na **obr. č. 50**.

Alternativou SEM je ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope), který může pracovat s relativně nízkým vakuem (cca 10 Torr). Komora vzorku bývá oddělena od ostatních částí mikroskopu a je naplněna zpravidla vodní parou. Vzorky nemusí být pokoveny.

Zavedení elektronových děl s emisí pole a imerzních čoček objektivů vedly k vývoji nových typů SEM s intenzivnějšími paprsky a zlepšily rozlišovací schopnost na úroveň nanometrů. To umožňuje studium málo rozměrných struktur na povrchu biologických objektů.



**Obr. č. 50** Zrnko pylu

<sup>183</sup> Binnig G. et al: „Surface Studies by Scanning Tunelling Microscopy“, Physical Review Letters, 49,1982, str. 57

<sup>184</sup> Drake B. et al „Imaging Crystals, Polymers, and Processes in Water with the Atomic Force Microscope“, Science, 243, 1989. str. 1586.

<sup>185</sup> Nebesářová J., Hozák P. „Současná elektronová mikroskopie v biologii“, Vesmír, 83, 2004, příloha „Mikroskopie dnes“, str. M9.

### 5.1.2.2. TEM, STEM

Transmisní elektronový mikroskop označovaný zkratkou TEM (Transmission Electron Microscope) pracuje s elektronovým svazkem v rozsahu energií elektronů 80–300 keV. Jeho přístrojová rozlišovací schopnost dosahuje hodnoty okolo 0,2 nm. Takový mikroskop je vhodný především ke studiu krystalických materiálů, kdy se kontrast zvyšuje orientací objektu tak, že se vlastně zobrazují sloupce několika atomů ve směru optické osy. Mikroskop může být rovněž použit jako skenovací (STEM – Scanning Transmission Electron Microscope). Mikroskop bývá v některých případech vybaven i zařízením pro spektroskopii ztrát energie elektronů (EELS – Electron Energy Loss Spectroscopy), která přináší informace o elektronové struktuře studovaného objektu. Takové studie nejrůznějších materiálů, zejména rozhraní rozdílných struktur, přinesly a stále přinášejí velmi důležité informace pro aplikace těchto materiálů v různých oborech. Situace v oblasti aplikace TEM v biologii je však značně jiná. Rozlišovací schopnost, které se při zobrazování biologických objektů a struktur dosáhne, je nejméně o řád horší a už vůbec není na atomární úrovni. Důvodem je především velmi malý kontrast, daný nedostatečným rozptylem elektronů na atomech biologických objektů, které jsou složeny z tzv. biologických prvků (H, N, O, C, P, S) s nízkým atomovým číslem. Biologické objekty se proto kontrastují přidáním atomů těžkých kovů (Mo, W, Os, U), které se uloží selektivně na některých místech pozorovaných struktur. Takové řešení má však nevýhodu v tom, že se preparovaný objekt vzdaluje své původní struktuře<sup>186</sup>.

Jinou možností zvýšení kontrastu biologických objektů je výrazné snížení energie elektronů zobrazovacího svazku. Elektrony s energií 5 keV jsou podstatně více rozptylovány jádry atomů s pozitivním nábojem a tím odstraněny clonou v objektivu z obrazu, což výrazně zvyšuje kontrast ve srovnání s kontrastem obrazu 100 kV TEM. Tato skutečnost byla známa již před několika desítkami let, ale pokusy takový mikroskop realizovat se podařily až v nedávno<sup>187</sup>. LVEM (Low-voltage Electron Microscope) může být konstruován nejen jako TEM nebo STEM, ale i jako SEM. Rozlišení může dosáhnout hodnoty 2,5 nm.

Při práci s biologickými preparáty se dnes používají kryo-immobilizační techniky, např. vysokotlaké zmrazování, což umožňuje zachování vzorků ve stavu, který lépe odráží jejich přirozenou strukturu a značně jsou omezeny nežádoucí artefakty. Běžně se dnes pozorují izolované makromolekulární komplexy jako např. ribozomy, protein-DNA komplexy a viry.

### 5.1.2.3. Elektronová tomografie (ET)

Elektronová tomografie (ET – Electron Tomography) je elektronomikroskopická technika pro zobrazení trojrozměrného obrazu. Vytváří 3D obrazy na základě mnohonásobné 2D projekce obrazů trojrozměrného objektu<sup>188</sup>. Elektronová tomografie je analogická různým druhům tomografií používaných v moderní medicíně, které jsou založeny na rtg. paprscích, paprscích vznikajících pozitronovou anihilací (PET), magnetické rezonanci (MRI) nebo ultrazvuku. 3D obraz je generován počítačem zpětnou projekcí jednotlivých 2D obrazů, kterým je přidělena určitá váha – **obr. č. 51**. Biologický vzorek (tabákový virus) umístěný v držáku elektronového mikroskopu je snímán z různých směrů naklápěním držáku – **obr. č. 51a**. Následuje proces počítačové zpětné projekce, přičemž každý sňatý obraz přispívá k rekonstrukci původní struktury – **obr. č. 51b**. Vysoká rozlišitelnost elektronové mikroskopie umožňuje 3D rekonstrukce, které umožňují zobrazit nejen dlouhé vláknité buněčné struktury jako

<sup>186</sup> Delong A. „Elektronový mikroskop dnes a zítra“, Čs. časopis pro fyziku, 3/2005, str.

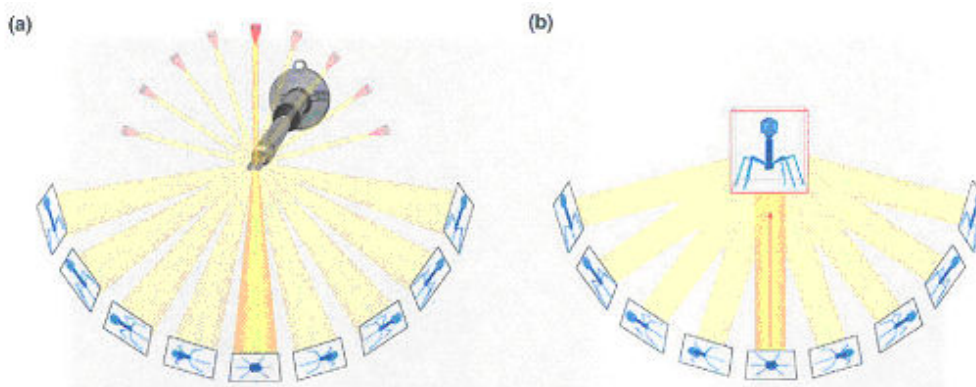
<sup>187</sup> Drummy L.F. et al „Low-voltage Electron Microscopy of Polymer and Organic Molecular Thin Films“, Ultramicroscopy, 99, 2004, str. 247.

<sup>188</sup> McIntosh et al „New Views of Cells in 3D: An Introduction to Electron Tomography“, Trends in Cell Biology, 15, 2005, str.

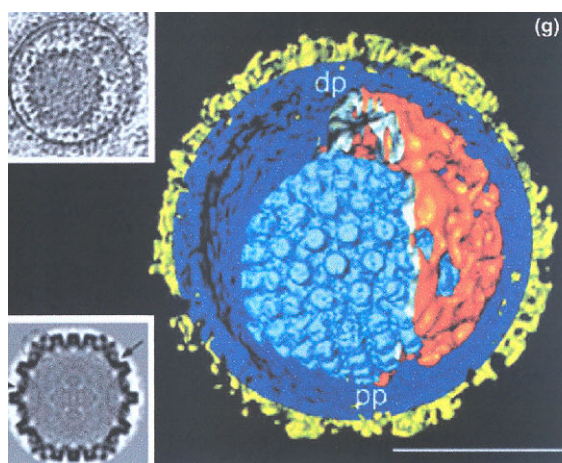
trajektorie cytoskeletálních vláken, ale i detaily struktury organel, a to na úrovni nanorozměrů.

Tomogram je 3D sestava dat reprezentovaná uspořádaným souborem objemových prvků zvaných voxely. Voxely jsou krychle o straně 1 – 4 nm, každá s určitou hodnotou škály šedé barvy, která odpovídá hustotě hmoty v dané oblasti vzorku. Jelikož jsou makromolekuly poněkud hustší než okolní vodní roztok, interagují s elektronovým paprskem mikroskopu silněji než jejich pozadí způsobem zvaným „rozptyl elektronů“. Rozptyl závisí silně na atomovém čísle sledovaných molekul a může být zvýšen pokrytím makromolekul těžkými kovy. Výslednou rekonstrukci pozorujeme obvykle v rovinách znázorněných v dvojrozměrných obrazech, při vybrané hodnotě třetího rozměru. ET lze použít i u podchlazených vzorků.

Příklad zobrazení ET je na **obr. č. 52**, kde je ve výřezu nahoře obraz virionu viru *Herpes simplex*. Tento obraz je barevně zvýrazněn (žlutá a modrá – obal virionu, oranžová – vnitřní obal obsahující proteiny, světlemodrá – nukleokapsid). Dolní výřez je výsledek zprůměrnění pro zlepšení poměru signál/šum<sup>189</sup>. Metoda se dále intenzivně vyvíjí.



**Obr. č. 51** Princip ET



**Obr. č. 52** Obraz virionu viru *Herpes simplex*.  
(Úsečka se rovná 100 nm)

<sup>189</sup> Frangakis A.S. et al „Identification of Macromolecular Complexes in Cryoelectron Tomograms of Phantom Cells“, PNAS, 99, 2002, str. 14153.

### 5.1.3. MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU

Mikroskopie skenující sondou (SPM – Scanning Probe Microscopy) je souborem experimentálních metod určených ke studiu struktury povrchů s atomárním rozlišením, s možností vytvoření trojrozměrných obrazů povrchu a stanovení jejich parametrů ve všech třech souřadnicích. SPM zaznamenala bouřlivý vývoj, který následoval po objevu metody skenovací tunelové mikroskopie (STM) v roce 1981<sup>190</sup>. Po uvedení základní metody STM došlo k mohutnému rozvoji techniky mikroskopie se skenující sondou a objevila se celá řada variací, vhodných pro studium různých typů a vlastností povrchů. Vývoj rovněž směřoval k zjednodušení konstrukce (původní přístroj nutně potřeboval vakuum), k vývoji matematického aparátu na zpracování získaných obrazů a odstranění artefaktů, hledání vhodných materiálů a technologií pro vytváření nosníků (ramének), hrotů a pohybových zařízení a k vytvoření teoretického popisu metod. Jednotlivé variace základní metody už nemusí být založeny na tunelovém jevu, ale využívají princip přesného polohování a velmi těsného přiblížení sondy k povrchu vzorku. Mnohdy jsou tyto metody sdruženy v jednom přístroji a umožňují i současný sběr více druhů signálů. Vlastnosti SPM jsou následující<sup>191</sup>:

- téměř atomární rozlišení, přímé zobrazení v prostoru
- trojrozměrný obraz v reálném čase, možnost studia dynamických procesů
- možnost použití v různých prostředích, vhodné především pro zobrazování biologických vzorků *in vivo* a *in vitro*
- vzhledem k malé velikosti SPM hlavy ji lze vestavět do zařízení pro jiné typy mikroskopických technik
- není zapotřebí žádného externího zdroje částic (jako třeba elektronů v elektronové mikroskopii, či světla ve světelné mikroskopii)
- lokální interakce (nestředované veličiny)
- není třeba speciálních úprav vzorku (někdy je potřeba vodivého pokrytí či fixace)
- velký rozsah zvětšení, nicméně při malých zvětšeních přináší obraz informaci pouze o místě těsně pod hrotem (u jiných technik se při menším zvětšení zvětší plocha, z níž se informace snímá)
- vlivem lokálnosti neobsahuje obraz informaci o zbytku povrchu
- mnohdy neexistuje jednoduchá inverzní transformace, tj. z naměřených hodnot není zpravidla možno přímo určit strukturu, lze jen porovnat s očekávanými hodnotami z modelu a ten případně opravit
- citlivost k vibracím a teplotním driftům
- je citlivá pouze na několik povrchových vrstev (často na jednu)
- velké množství artefaktů (falešných obrazů), zvláště hrot se vzorkem si mohou vyměnit roli (tzv. zrcadlení hrotu)
- vliv adsorbované vody na povrchu vzorku
- obtížnost opětovného zobrazení téhož místa na vzorku
- SPM není obecně citlivá na chemickou podstatu atomů, určit typ atomu lze jen z doplňujících metod a úvah
- metoda registruje zvlnění určité fyzikální vlastnosti (např. plochy konstantní hustoty náboje), které ovšem klesá se vzdáleností od povrchu

<sup>190</sup> Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E. „Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy“, Phys. Rev. Lett., 49, 1981, str. 57

<sup>191</sup> Kubínek R., Vůjtek M, Mašláň M: „Mikroskopie skenující sondou“, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 2003, str.13, ISBN 80-244-0602-0



Pro biologii je největším přínosem SPM metod možnost zobrazovat v libovolném okolním prostředí, což zabrání např. vysychání struktur a umožňuje zobrazit i živé organizmy (např. bakterie, často se zobrazuje DNA). Problémem při těchto měřeních je nalezení vhodného podkladového povrchu (nejčastěji se používá čistý pyrolitický grafit pro STM a slída pro AFM), fixace vzorku a zajištění jeho vodivosti (pro STM) nebo volba vhodné síly (pro AFM). Velkým problémem však zůstává interpretace naměřených výsledků.

V biologii dosáhla z metod SPM nejrozsáhlejšího využití mikroskopie atomárních sil (AFM), v menším měřítku pak SICM (spinová mikroskopie s iontovou sondou), SCM (kapacitní sondová mikroskopie), SCPM (sondová mikroskopie chemického potenciálu) a SThM (tepelná sondová mikroskopie).

Příkladem SPM, založeném na invertním optickém mikroskopu a spojujícího několik módů (metod) v jednom přístroji a umožňujícího práci v tekutém prostředí, je „Solver Bio“ od ruské firmy Nano Technology Instruments<sup>192</sup>. V tekutině umožňuje práci v kontaktním nebo polokontaktním AFM módu, jako LFM (Lateral Force Microscopy), AFM litografii atd., na vzduchu pak práci navíc k výše uvedeným módům v módu MFM (Magnetic Force Microscopy), EFM (Electrostatic Force Microscopy), SCM (Scanning Capacitance Microscopy), KFM (Kelvin Probe Microscopy).

### 5.1.3.1 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Metoda AFM (Atomic Force Microscopy) je založena na mapování atomárních sil na povrchu zkoumaného vzorku. Sondou je tzv. *cantilever* – pružný nosník (raménko) na jehož konci je ostrý hrot. Hrot může být z různých materiálů, typickým je křemík, nebo na něm může být připevněna magnetická částice či molekula. Působením přitažlivých a odpuzivých sil (Van der Waalovy síly, elektrostatické nebo magnetické síly) dochází k ohýbání raménka. Ohyby jsou detekovány laserovým paprskem a slouží pro sestavení obrazu povrchu, např. sledováním profilu konstantní síly. Schéma principu AFM je na **obr. č. 53**. Zobrazení skenovaného povrchu je možné provádět na vzduchu, ve vakuu a v tekutině (možné uspořádání pro pozorování v tekutině je na **obr. č. 54**). AFM mohou pracovat v několika módech, např.:

- v kontaktním módu, kdy hrot je v kontaktu s povrchem vzorku, raménko je pevné a identifikuje vertikální změny povrchu (AFM)
- v kontaktním módu, kdy hrot je v kontaktu s povrchem vzorku, při skenování je vlečen po povrchu a raménko je zkrucováno v závislosti na změnách koeficientu tření povrchu (LFM)

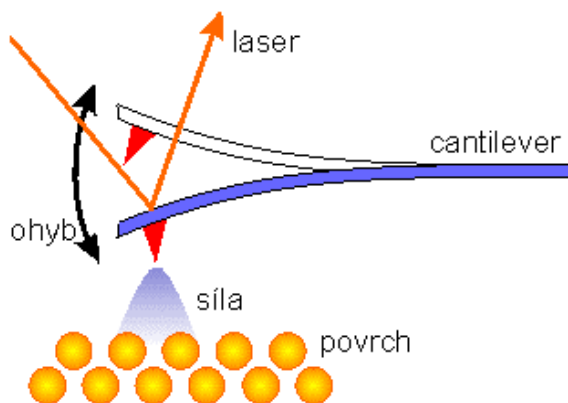
Kontaktní mód je vhodný zejména pro zkoumání pevných povrchů a při ostrém hrotu je dosahováno atomární rozlišení. Při zkoumání biomolekul je rozlišení menší, protože biomolekuly se mohou při skenování deformovat či poškodit, jelikož je obtížné je dostatečně pevně spojit s povrchem.

- v módu s oscilujícím hrotem (tapping mode, pokleповý mód, přerušovaný kontakt), kdy raménko vibruje kolmo k povrchu a hrot je v interakci s povrchem pouze při spodní poloze amplitudy. Tento mód lze použít na vzduchu i v kapalině. Mód umožňuje aplikovat menší síly na zkoumané vzorky, např. biologické makromolekuly, zlepšuje rozlišitelnost a omezuje jejich porušení.

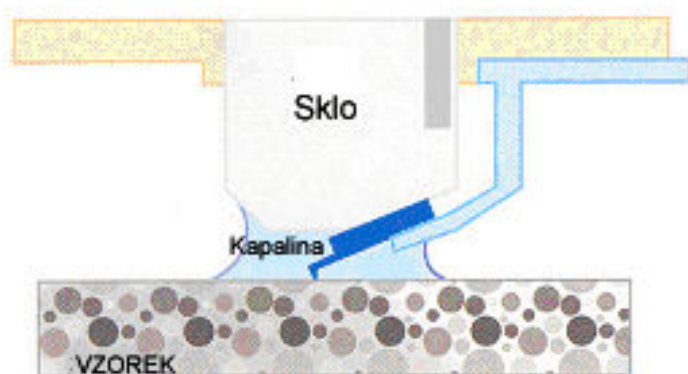
---

<sup>192</sup> www.ntinstruments.com

Obr. č. 53 Princip AFM



Jinou alternativou je zpevnění biologického vzorku, čehož se dosahuje ochlazením vzorku i skenovacího přístroje na teplotu kapalného dusíku (atomová kryo-mikroskopie). Zobrazování pomocí módu s oscilujícím hrotem v kapalině je velmi důležitá metoda v biologickém výzkumu i výzkumu nových léků. Umožňuje např. připojení protilátek, které



jsou specifické pro jednotlivé proteiny, k hrotu raménka. Reaguje-li protilátka s proteinem, jejím targetem, vzniká množství údajů, které nelze získat při použití pouhého hrotu. Metoda rovněž umožňuje studium reakcí buněk na různé stimuly, což je též velmi důležité při vývoji nových léků.

Obr. č. 54 Schéma uspořádání mikroskopu pro práci v tekutině

Prvá práce o použití AFM v biologii byla publikována O.Martim et al v roce 1988<sup>193</sup>. V současné době můžeme v odborné literatuře najít tisíce článků popisujících použití AFM v různých oblastech biologie<sup>194</sup>.

Zkoumají se proteiny, lipidy, DNA, RNA, nejmenší biomolekuly i viry a živé buňky. AFM našla své užitečné využití ve farmakologii, biotechnologii, mikrobiologii, strukturní biologii, molekulární biologii, genetice a v dalších oblastech<sup>195</sup>.

AFM může být použit rovněž pro jiné účely než k zobrazování. Používá se např. pro měření intra- a intermolekulárních sil, měření viskoelastických vlastností povrchu buněk *in vivo* atd. Studovány již byly i různé dynamické projevy při pohybu biomolekul, aktivita draslíkových kanálů v membráně ap.

AFM používaný jako zobrazovací přístroj má své nedostatky. Tkáně se zobrazují obtížně, protože jsou velmi měkké a členité a hrot sondy se může snadno při skenování povrchu

<sup>193</sup> Marti, O. et al: „Scanning Probe Microscopy of Biological Samples and Other Surfaces“, J Microscopy, 152, 1988, str. 803

<sup>194</sup> Müller D.J., Anderson K. „Biomolecular Imaging Using Atomic Force Microscopy“, Trends in Biotechnology, 20, 2002, str. S 45.

<sup>195</sup> [www.spmtips.com](http://www.spmtips.com),

Kubínek R. et al „Biologické aplikace AFM“, Čs. čas. pro fyziku, 53, 2003, str. 109.

vzorku zachytit. Rozšíření AFM v bioanalytických aplikacích je omezeno výkonností zařízení a nezbytnými vysokými znalostmi personálu při interpretaci získaných snímků. Dále i tím, že se jedná o relativně drahá zařízení. Ve vývoji jsou paralelní submikrometrické soubory ramének s cílem zvýšit výkonnost metody.

#### 5.1.4. RTG DIAGNOSTIKA A NUKLEÁRNÍ ZOBRAZOVÁNÍ

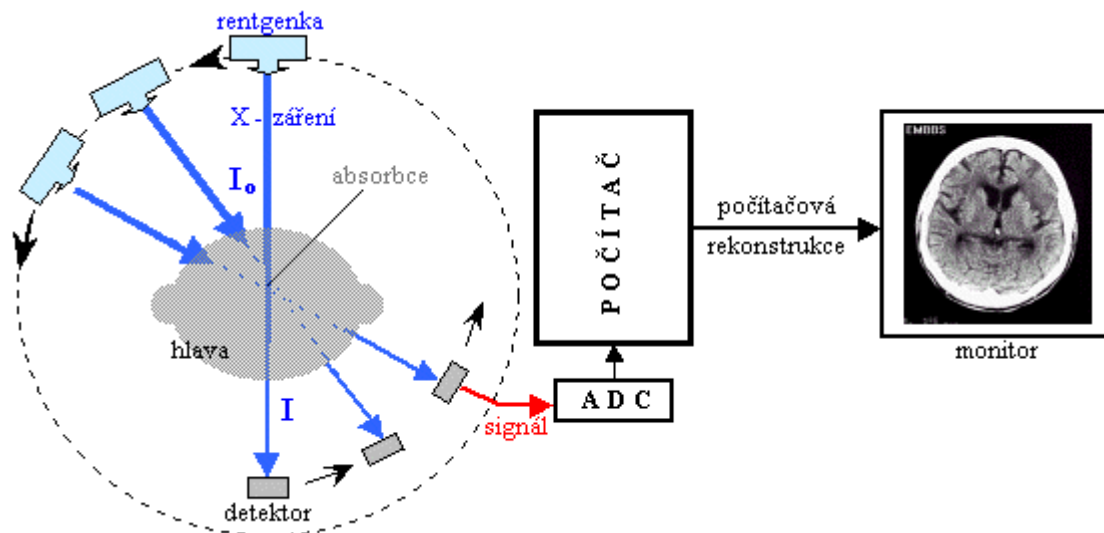
##### 5.1.4.1 Rentgenová diagnostika

**Rentgenové zobrazování – skiografie.** Při prostém rtg snímkování, zvaném skiografie, dopadá rtg. záření prošlé vyšetřovanou tkání na fotografický film obsahující halogenidy stříbra (bromid stříbrný), v němž fotochemickou reakcí dochází k uvolňování stříbra z jeho vazby ve sloučenině - vzniká latentní obraz, který je při vyvolání ve vývojce zviditelněn pomocí hustoty zrníček koloidního stříbra; zbylý bromid stříbra se rozpustí v ustalovači. Hustota zčernání filmu je úměrná množství prošlého rtg. záření. Vzniklý rtg fotografický obraz představuje negativní zobrazení hustoty tkáně: místa s nízkou hustotou (měkké tkáně) mají nižší absorpci a proto vysoké zčernání, místa s vysokou densitou (např. kosti) více absorbují rtg. záření a jsou proto na filmu zobrazena světle (s nízkým zčernáním). Jde o klasickou a stále používanou metodu.

**Rentgenová tomografie - CT.** Pro odstranění nevýhod planární rtg diagnostiky (možnost překrývání a superpozice struktur uložených v různých hloubkách) a pro získání komplexního zobrazení struktur v různých hloubkách, byla vyvinuta transmisní rentgenová tomografie poskytující trojrozměrné zobrazení tkání v organismu. Tomografické rtg zobrazení se dosahuje tím, že vyšetřovaná oblast se prozařuje rtg. zářením pod řadou různých úhlů (v rozsahu 180-360°): rentgenka a naproti ní umístěný detektor rtg. záření rotují kolem těla pacienta, přičemž úzký svazek záření prozařuje vyšetřovanou tkáň a jeho intenzita je detekována a převáděna na elektrický signál (**obr. č. 55**); vyhodnocuje se zeslabení paprsku v důsledku absorpce tkání. Z množství integrálních hodnot získaných prozařováním pod řadou úhlů 0-360° se pak metodou zpětné projekce provede rekonstrukce absorpční mapy, čímž vznikne obraz příčného řezu vyšetřovanou oblastí. Na tomto obraze jsou citlivě a s vysokým rozlišením zobrazeny struktury uložené v různých hloubkách v organismu - jedná se o obraz tomografický.

Postupným podélným lineárním posunem pacienta vzhledem k systému rentgenka-detektor můžeme vytvořit řadu obrazů příčného řezu (vrstev), které umístěny vedle sebe vytvářejí trojrozměrný tomografický obraz vyšetřované oblasti. Vzhledem k výpočetní náročnosti rekonstrukční procedury lze toto provést pouze s pomocí počítače - proto se tato metoda nazývá **počítačová tomografie CT** (Computerized Tomography).

Kromě prostorového tomografického zobrazení je hlavní předností CT v porovnání s konvenčním rtg zobrazením to, že je schopna rozpoznat a zobrazit i nepatrné rozdíly v lineárních součinitelích zeslabení rtg. záření, které proniká vyšetřovanou tkání. Je to dáno v první řadě elektronickou detekcí rtg. záření, která je schopna zachytit jemnější rozdíly a širší rozsah dynamiky, než klasický rtg. film. K výbornému rozlišení dále přispívají i metody počítačové rekonstrukce a filtrace obrazu, jakož i možnosti flexibilního nastavení optimální modulace obrazu (jas, kontrast). Pro kvalitnější zobrazování se používá kontrastních látek.



Obr.č. 55 Zjednodušené schéma počítačové tomografie CT

**Rtg kostní densitometrie.** Radiografické vyšetření skeletu patří mezi nejčastější a nejdůležitější výkony rtg. diagnostiky. Speciální metodou v této oblasti je kostní densitometrie - metoda pro zjišťování hustoty kostní tkáně na základě míry absorpce rtg. záření, stanovené pomocí rtg. absorpční fotometrie. Moderní rtg. densitometrické přístroje používají prozařování vyšetřovaného místa rozbíhavým svazkem rtg. záření s následnou detekcí prošlého záření digitálním snímačem obrazu do paměti počítače. Nejdokonalejší přístroje tohoto druhu umožňují provádět celotělovou obrazovou diagnostiku kostní tkáně, stanovit obsah svalové hmoty, tukové tkáně, vody a minerálů v jednotlivých částech těla. Kostní densitometrie hraje klíčovou úlohu při diagnostice osteoporózy.

**Rtg mamografie.** Je to zobrazení případných nehomogenit a oblastí zvýšené hustoty tkáně v ženském prsu, které by mohly svědčit pro nádorový proces.

#### 5.1.4.2. Nukleární zobrazování – tomografická scintigrafie

Ústřední metodou nukleární medicíny je **radioisotopová diagnostika *in vivo***: do organismu aplikujeme vhodnou chemickou látku s navázaným radionuklidem - tzv. **radioindikátor** či **radiofarmakum**. Tato látka vstoupí do metabolismu a distribuuje se v organismu podle farmakokinetiky daného radioindikátoru. Nejznámějším příkladem je aplikace radioaktivního jodidu sodného  $\text{NaJ}^{131}$ , který se jako každý jód akumuluje ve štítné žláze. Byla vyvinuta řada druhů radiofarmak s afinitou k ledvinám, játrům, kostem, myokardu, některým nádorovým či zánětlivým tkáním, pro jejichž funkci je daná látka indikátorem. Míra lokální akumulace radiofarmaka záleží na intenzitě místních metabolických a funkčních dějů v orgánech a tkáních. Případné poruchy funkce lze pomocí scintigrafického zobrazení lokalizovat a kvantifikovat. Nebo se radionuklid vstříkne do krevního oběhu a sleduje se **dynamika** jeho **průchodu** srdcem, plícemi a velkými cévami (v tomto případě bez metabolické vazby na konkrétní orgán či tkáň).

Distribuce radioindikátoru tedy odráží konkrétní fyziologický či patologický stav nebo funkci příslušných orgánů a tkání. V nejjednodušších případech stačí prosté změření intenzity vycházejícího záření z určitého místa (např. ze štítné žlázy - pro stanovení její akumulace) kolimovanou sondou. Pro komplexnější diagnostiku však potřebujeme změřit - zmapovat - zobrazit - celou distribuci radioindikátoru, včetně lokálních detailů a anomálií. K tomu slouží metoda zvaná **scintigrafie**. Prostorové trojrozměrné zobrazení poskytuje **scintigrafie**

**tomografická.** Je realizována nejčastěji jako série planárních obrazů vyšetřovaného místa, snímaných pod mnoha různými úhly ( $0^{\circ}$ - $360^{\circ}$ ) detektorem kamery obíhajícím kolem pacienta. Počítačovou rekonstrukcí se pak z těchto obrazů konstruuje tomografické obrazy příčných řezů vyšetřovaným objektem. Tato metoda se označuje jako **SPECT** (Single Photon Emission Computed Tomography - jednofotonová emisní počítačová tomografie).

**PET** - pozitronová emisní tomografie je další tomografickou metodou. V tomto případě je aplikován pozitronový b+ radioindikátor, který v místech své distribuce emituje pozitrony e+, které vzápětí anihilují s elektrony e- za vzniku dvou fotonů vylétajících do opačných směrů ( $180^{\circ}$ ). Tomografického efektu se pak dosahuje současnou koincidenční detekcí těchto dvojic fotonů, načež počítačovou rekonstrukcí velkého počtu takových koincidenčních paprsků se opět vytváří tomografický obraz příčného řezu vyšetřovanou oblastí. Metoda se používá k zjištění nepravidelností v činnosti mozku a při lokalizaci epileptického záchvatu. Technika využívá k znázornění hypometabolických oblastí mozku cukerní mozkový metabolismus. Hypometabolické oblasti obsahují méně glukózy, než je obvyklé v poškozené tkáni.

#### 5.1.4.3. Zobrazování magnetickou rezonance - MRI

**MRI** (Magnetic Resonance Imaging) - zobrazování magnetickou rezonancí, se používá k zobrazování fyziologických změn tkání živých organismů (není pro ně škodlivá) a v geologii (pro indikaci vody v geologických strukturách). Metoda byla vynalezena v roce 1974 Damadianem<sup>196</sup>. Metoda závisí na relaxačních vlastnostech excitovaných vodíkových jader ve vodě a v silném magnetickém poli. Vysvětlení jejího principu přesahuje rámec této publikace. Používané magnetické pole má zpravidla intenzitu 7 Tesla. Typická rozlišitelnost v lékařství je cca  $1\text{ mm}^3$ , ve výzkumných laboratořích se dosahuje až  $1\mu\text{m}^3$ . Jelikož získaný kontrast zobrazení není vždy dostatečný, např. pro anatomická nebo patologická studia, používají se pro jeho zesílení různé zesilovací techniky, např. aplikace kontrastních látek. Používá se voda pro znázornění žaludku, paramagnetické kontrastní látky (sloučeniny gadolinia pro zobrazování nádorů a tělních tekutin) a v poslední době superparamagnetické látky (nanočástice oxidů železa pro zobrazování např. jater – viz 5.3.1.4..) a méně často diamagnetické látky ( $\text{BaSO}_4$  pro zobrazování trávicího ústrojí).

V průběhu doby byly vyvinuty různé mírně odlišné metody založené na principu nukleární magnetické rezonance<sup>182</sup>: D-MRI (difúzní MRI), MRA (magnetická rezonanční angiografie), MRS (magnetická rezonanční spektroskopie), prozatím kontroverzní fMRI (funkční MRI)<sup>197</sup>, I-MRI (intervenční MRI) atd.

#### 5.1.4.4. Rtg. mikroskopie

„Měkká“ rtg. mikroskopie (Soft X-ray Microscopy), užívající rentgenovy paprsky vyráběné v synchrotronových zdrojích světla, je rozvíjející se způsob biologického zobrazování pro zkoumání neporušených hydratovaných buněk v přírodním stavu. Kratší vlnová délka rtg. paprsků (0,5 – 5 nm) umožňuje studium struktury a chemie buněk při rozlišitelnosti 5 – 8 krát lepší (30 – 50 nm), než je dosahována ve světelných mikroskopech<sup>198</sup>. Výhodou je minimální příprava vzorků, jejich tloušťka může dosáhnout až 10  $\mu\text{m}$  a vzorky není zapotřebí fixovat,

<sup>196</sup> <http://en.wikipedia.com/wiki/>

<sup>197</sup> Chlebus P. et al „Funkční magnetická rezonance – úvod do problematiky“, Neurologie pro praxi, 3/2005, str. 133.

<sup>198</sup> Jacobsen Ch., Kirz J. „X-ray Microscopy with Synchrotron Radiation“, Nature Structural Biology, 5, 1998, str. 650.

Abraham-Peskir J.V. „X-ray Microscopy with Synchrotron Radiation: Applications to Cellular Biology“, Cell Mol. Biol., 46, 2000, str.1045.

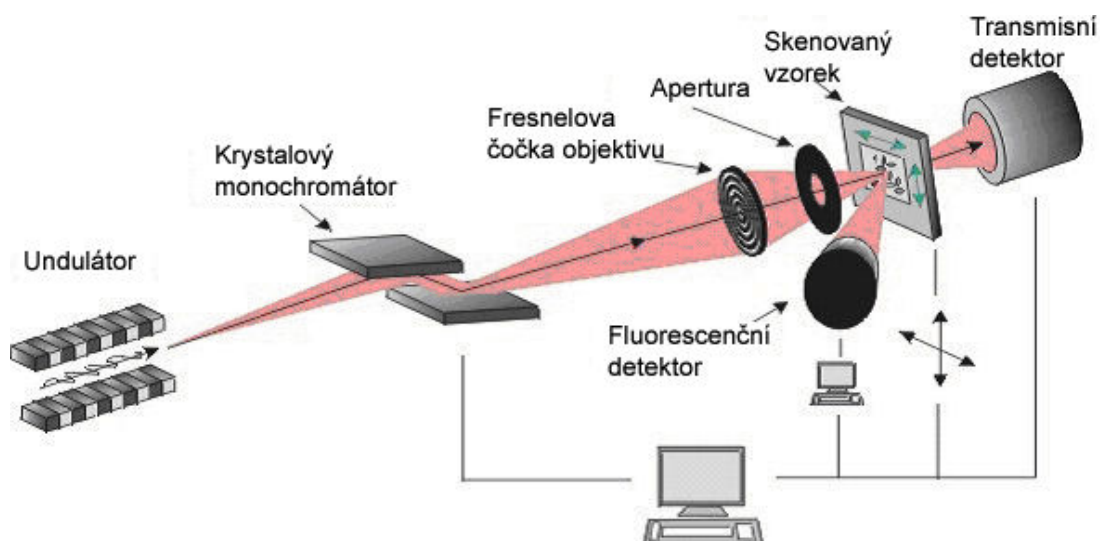
barvit, sušit nebo umístit do vakua. Rtg. paprsky vyvolávají ve většině materiálů fluorescenci, která může být využita pro stanovení chemických prvků v daném objektu.

Byla vyvinuta řada variant rtg. mikroskopie a spektroskopie:

- SXM (Scanning X-ray Microscope)
- STXM (Scanning Transmission X-ray Microscopy)<sup>199</sup>
- XDM (X-ray Diffraction Microscopy)<sup>200</sup>
- XFT (X-ray Fluorescence Tomography)
- XSM (X-ray Spectromicroscopy)
- XPEM (X-ray Photoelectron Microscopy)
- XMM (X-ray Magnetic Microscopy)
- XAS (X-ray Absorption Spectroscopy)
- XH (X-ray Holography)
- atd.

Rtg. mikroskopy bývají často instalovány na velkých zdrojích světelného záření, jako jsou Elletra Synchrotron Light Laboratory v Terstu, ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) v Grenoble, NSLS (National Synchrotron Light Source) v Stone Brook University, Stone Brook, NY, BESSY v Göttingen atd. Ve světě je provozováno asi 50 zdrojů synchrotronového záření.

Na obr. č. 56 je schéma skenovacího rtg. mikroskopu ID21 v ESRF. Zařízení má délku přes 25 m a může pracovat i jako XAS, XSM a XFT<sup>201</sup>.



**Obr. č. 56** Skenovací rtg. mikroskop ID21 v ESRF.

Rtg. mikroskopy s „měkkým“ zářením se používají v biologickém výzkumu ve dvou oblastech:

- Mapování rozdělení prvků nebo sloučenin v tkáních
- Studium jednotlivých buněčných složek

Např. se zkoumalo rozdělení vápníku ve vlasech, karcinogenní vliv chrómu, biologická role kovových iontů (vanad v krvinkách), vlastnosti biofilmů a kolonií bakterií, atd.

<sup>199</sup> Hitchcock A.P. et al „Towards Practical Soft X-ray Spectromicroscopy of Biomaterials“, J. Biomater. Sci. Polym Ed., 13, 2002, str.919.

<sup>200</sup> Shapiro D. et al „Biological Imaging by Soft X-ray Diffraction Microscopy“, PNAS, 102, 2005, str. 15343.

<sup>201</sup> www.esfr.fr/UsersAndScience/Experiments/ID21

### 5.1.5. LÉKAŘSKÁ SONOGRAFIE

Lékařská sonografie je důležitá zobrazovací metoda při vyšetřování tkání. Poprvé byla použita v roce 1940. Používá vysokofrekvenčních zvukových vln (2 - 13 MHz), které jsou tkání odráženy s různou intenzitou, přičemž se vytváří 2D obraz, tradičně na TV monitoru. Při výběru frekvence se rozhoduje mezi požadavky na vysokou rozlišitelnost a hloubku penetrace v těle. Další podrobnosti o metodě a jejím používání, přednostech a nedostatcích, lze najít např. na stránce<sup>202</sup>

### 5.1.6. VYBRANÉ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ ANALYTICKÉ TECHNIKY

V průběhu posledních desetiletí bylo vypracováno a do praxe uvedeno mnoho chemických, fyzikálních a biochemických analytických metod používaných v molekulárně biologickém výzkumu, při vývoji nových léků i v lékařské praxi. Jednotlivé vědní obory a podobory používají specializované metody (např. imunologie, cytogenetika, proteomika aj.). Rozvoj moderních technologií (počítače, elektronika, optika) vyvolal jejich uplatnění v analytických a manipulačních přístrojích, které jsou v mnoha případech automatizované a vysoce výkonné.

Analytické metody jsou připraveny především pro biologické cíle jako jsou buňky, DNA a proteiny. Výzkum a vývoj v této oblasti je extrémně interdisciplinární a vyžaduje značnou synergii při řešení jednotlivých problémů a probíhá se značnou intenzitou.

V této části publikace budeme charakterizovat jen některé nejznámější metody a zejména ty, které mohou být modifikovány za přispění nanotechnologií.

#### 5.1.6.1. ELISA

**ELISA** (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay) – je biochemická technika používaná zejména v imunologii pro detekci přítomnosti protilátky nebo antigenu ve vzorku. Používají se dvě protilátky umístěné na mikrotitrační destičce. Jedna je specifická k antigenu a druhá je spojena s enzymem, což se objevuje v názvu metody a je příčinou vytvoření chromogenního nebo fluorogenního substrátu, který vytváří signál. Enzym působí jako zesilovač. Signál je detekován spektrofotometrem nebo jiným optickým zařízením<sup>203</sup>. ELISA může poskytovat jak kvalitativní, tak kvantitativní údaje. Existují různé varianty metody.

#### 5.1.6.2. Hmotová spektrometrie

**Hmotová spektrometrie (MS – mass spectrometry)** je analytická technika používaná pro měření poměru hmoty ku náboji v iontech. Je všeobecně používána pro stanovení složení fyzikálního vzorku vytvořením hmotového spektra reprezentujícího jednotlivé hmoty složek vzorku. Hmotové spektrum s obvykle zjišťuje ionizací vzorku a separací iontů s lišící se hmotností, s následujícím záznamem jejich relativního zastoupení měřením intenzit toku iontů. Typický hmotový spektrometr sestává ze tří částí: zdroje, analyzátoru hmoty a detektoru. Existuje několik principů hmotových spektrometrů (kvadrupólový, průletový /time-of-flight/, založený na cyklotronové rezonanci iontů, magnetický sektorový). Metoda se používá v řadě oblastí, např. při identifikaci neznámých sloučenin stanovením hmoty molekul sloučeniny, pro stanovení poměru izotopů prvků ve vzorku, pro datování věku fosílií, při stopové analýze plynů, v kosmickém výzkumu, ve farmakokinetice, při výzkumu proteinů (identifikace, kvantifikace, stanovení struktury atd.). Moderní hmotové spektrometry jsou:

<sup>202</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/Ultrasonography>

<sup>203</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>

**MALDI TOF-MS** (Matrix Assisted Laser Desorption/ionisation Mass Spectrometry) – metoda umožňuje odpaření a ionizaci (měkkou) některých biologických vzorků z pevné fáze do plynné. Je vhodná pro měření molekulární hmotnosti peptidů, proteinů, DNA a polysacharidů. MALDI odkazuje na typ zdroje. TOF (time-of-flight) odkazuje na typ analyzátoru – měří se rychlost průletu iontů spektrometrem, která je úměrná hmotě látky.

**SELDI – TOF** (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time of Flight) – je poměrně nová proteomická technologie pro kvantitativní analýzu směsí proteinů. Používají se ocelové nebo hliníkové podložky (čipy), jejichž povrch je upraven chemicky (hydrofilicky, hydrofobicky, s imobilizovanou afinitou kovu, kationické nebo anionické) nebo biologicky (protilátkami, DNA, enzymy nebo receptory) tak, že tvoří „pasti“ o průměru 1-2 mm. Různě upravený povrch dovoluje zachycení proteinů, v závislosti na jejich vlastnostech. Na povrch „pastí“ se aplikuje malý objem (0,1 µl) roztoku tkáně nebo tělní tekutiny a proteiny se váží podle svých afinit k „pastím“. Po odmytí nespecificky nebo slabě navázaných proteinů se vázané proteiny uvolní laserem a ionizují pro následující hmotovou spektrometrii<sup>204</sup>.

**TOF SIMS** (Time-of-flight Secondary-ion Mass Spectrometry) – hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s měřením doby letu iontů. Měření molekulární hmotnosti.

### 5.1.6.3. Elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda probíhající v roztoku mezi dvěma elektrodami, při níž se dělí nabitě molekuly (ionty) na principu rozdílných elektroforetických mobilit. Molekuly se pohybují v daném roztoku směrem a rychlostí, určenými jejich nábojem a velikostí. Byla vyvinuta řada elektroforetických metod. Zvláště populární jsou různé druhy gelové elektroforézy lišících se především použitým druhem gelu, ve kterém elektroforéza probíhá. V mnoha případech je gel sesíťovaný polymer, jehož složení a porozita je vybrána v závislosti na hmotnosti a složení analyzovaných molekul. Např., separujeme-li proteiny nebo malé fragmenty DNA, RNA či oligonukleotidů, používá se obvykle akrylamidový gel různé koncentrace. Separujeme-li velké části nukleových kyselin (s více než několik set bazí) je preferovaným gelem čištěná agaróza<sup>205</sup>. DNA však není možné v gelu vidět, a proto se barví fluoreskujícími látkami nebo označí izotopem (např. <sup>32</sup>P). Provádějí se pokusy s označováním DNA kvantovými tečkami. Gelová elektroforéza i další druhy elektroforézy jsou součástí řady molekulárně-biologických, genetických, mikrobiologických a biochemických metod.

### 5.1.6.4. Analýza DNA

U DNA zjišťujeme zejména:

- Genetickou podstatu konkrétních proteinů
- Mutace – bodové, sekvenční, aberace chromozómů, delece/inzerce nukleotidů
- Polymorfizmy – konkrétní mutace vyskytující se v populaci s frekvencí vyšší než 1%
- Podobnost DNA mezi druhy organismů
- Koncentraci, čistotu, chemické vazby s proteiny a mnoho dalších vlastností

V následujícím textu bude podán stručný přehled metod a nástrojů sloužících k manipulaci, třídění a identifikaci DNA a RNA s důrazem na možný příspěvek nanotechnologií.

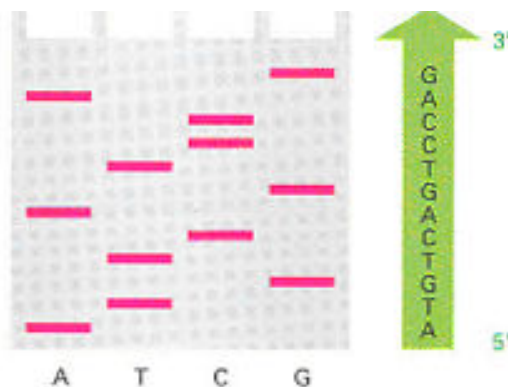
<sup>204</sup> Merchant M, Weinberger S.R. „Recent Advancements in Surface-enhanced Laser Desorption/ionization of Flight-mass Spectrometry“, *Electrophoresis*, 21, str. 1164.

<sup>205</sup> **Agaróza** – složka agaru, což je extrakt z červené mořské řasy



#### 5.1.6.4.1. Stanovení nukleotidové sekvence DNA

Koncem sedmdesátých let minulého století byly objeveny rychlé a jednoduché metody pro stanovení sekvence nukleotidů v izolovaném fragmentu DNA. DNA sekvenování je proces stanovení uspořádání nukleotidů v daném fragmentu DNA zvaném DNA sekvence. V současné době se DNA sekvenování provádí většinou enzymovou metodou vyvinutou Sangerem v roce 1977. Princip metody spočívá v produkci řady řetězců DNA *in vitro* za podmínek, které zajišťují, že nově vznikající řetězec DNA bude ukončen po dosažení jednoho konkrétního nukleotidu. Ke stanovení kompletní nukleotidové sekvence dvouvláknové DNA je nutné nejprve od sebe oddělit oba řetězce a jeden z nich je použit jako templát pro sekvenování. Ve čtyřech nezávislých reakcích se stejným jednořetězcovým DNA templátem jsou použity čtyři různé dideoxyribonukleosidtrifosfáty. Výsledkem každé reakce je sada molekul DNA, které končí na různých místech původní sekvence. Vzniklé fragmenty DNA, se liší svojí délkou o jediný nukleotid, přičemž z typu použité reakce je známo, kterým nukleotidem fragment končí. Produkty všech čtyř sekvenačních reakcí jsou paralelně vedle sebe elektroforeticky rozděleny v polyakrylamidovém gelu. Nově syntetizované fragmenty jsou detekovány radioaktivně nebo fluorescenčně. Fragmenty jsou v gelu rozděleny podle velikosti a sekvence původní DNA. V každém sloupci reprezentují proužky fragmenty DNA, které končí vždy stejným druhem nukleotidu, např. adeninem v levém sloupci na **obr. č. 57**. Směrem zdola nahoru lze pak po porovnání všech sloupců odečíst sekvenci nově syntetizované DNA (viz zelená šipka). Sekvence je stejná jako 5'-3' řetězec původní dvouvláknové DNA<sup>206</sup>.



**Obr. č. 57** Výsledek DNA sekvenování Sangerovou metodou

Metoda je dnes plně automatizována a moderní sekvenátory jsou schopny sekvenovat nejméně 384 fluorescenčně označených vzorků v jedné dávce, kterých může být 24 za den.

Důležitou metodou sekvenování DNA je metoda zvaná **shotgun**. DNA se nejdříve rozstříhá na menší kousky. Vzniklé fragmenty se vloží do bakteriálního plasmidu a pomnoží. Získané klony se sekvenují náhodně. Po ukončení sekvenování vstupují do děje počítače. Speciální program porovnává všechny získané fragmenty mezi sebou a identifikuje sekvence, které se shodují (překrývají). Na základě těchto překryvů se postupně rekonstruuje celý řetězec DNA. Příklad použití metody při výzkumu mořským mikroorganismů lze nalézt v<sup>207</sup>.

V poslední době je ve vývoji tzv. **sekvenování pomocí nanopórů**. Nanopóry jsou v daném případě malé dírky o průměru cca 1 nm. Nejprve se vytvoří leptáním v křemíku větší dírky, které se postupně zaplňují prostřednictvím elektronového paprsku. Princip metody spočívá

<sup>206</sup> Alberts B. et al.: „Základy buněčné biologie“, Espero Publishing, Ústí nad Labem, 2002, ISBN 80-902905-0-4, str. 319.

<sup>207</sup> Koblížek M., Sobotka R. „Jak se loví geny v Sargasovém moři“, Vesmír, 85, 2006, str. 95.

v ponoření nanopóru do vodivé tekutiny a uplatnění napětí napříč póru, což má za následek, že DNA přítomná v roztoku začne migrovat k pórům a případně i přes ně. Rozměr póru zajišťuje, že DNA v roztoku je protlačována dírou jako rovný řetězec, po jedné bazi. Každý nukleotid ovlivňuje elektrické vlastnosti (elektrický proud) díry jiným charakteristickým způsobem, a tak je možné přímo číst sekvenci DNA. Není nutná žádná amplifikace DNA<sup>208</sup>.

#### 5.1.6.4.2. Amplifikace nukleotidových sekvencí - polymerázová řetězová reakce (PCR)

Molekulární analýzy byly v minulosti limitovány nutností izolovat velké množství čisté DNA, což v některých případech – např. u muzejního materiálu, fosilií nebo u vzorků obsahujících velmi malé množství nativní DNA (moč, stopy krve či spermatu, chlupy, exkrementy apod.) – nebylo možné. Našlo se řešení – **PCR** (polymerázová řetězová reakce). PCR je elegantní a jednoduchá metoda, která umožňuje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA prakticky v neomezeném množství, přičemž množství původního vzorku DNA může být extrémně malé (teoreticky ho může představovat jediná molekula). Navíc díky tomu, že nasyntetizovaná DNA obsahuje prakticky výhradně studovanou sekvenci, není ji zpravidla nutno dále purifikovat.

Základní cyklus se skládá ze tří kroků:

1. **Denaturace**, při které se roztok zahřeje na teplotu 92-95°C a kdy dochází k disociaci fragmentů dsDNA na jednotlivé řetězce.
2. **Zchlazení a navázání primerů<sup>209</sup> (annealing)**. Tento krok je z celého procesu nejdůležitější, protože na správném navázání primerů závisí úspěch celé PCR. Teplota se zpravidla liší v závislosti na délce a dalších vlastnostech primerů (složení bazí apod.) – obvykle se pohybuje mezi 45 a 60°C, v extrémních případech však byly použity i teploty 37°C nebo naopak 72°C. Doba trvání prvních dvou kroků je krátká, 15-60s, většinou kolem 30s.
3. Posledním krokem cyklu je **extenze**, při které dochází k vlastní syntéze nových řetězců, navazujících na 3'-konce primerů. Tato reakce je katalyzována *Taq* polymerázou při teplotě 72°C. Při této teplotě jsou volné nukleotidy začleňovány do vznikajícího řetězce přibližně rychlostí 35 za sekundu. Délka trvání této fáze závisí na délce syntetizovaného fragmentu: pro kratší fragmenty (zhruba do 200-500bp) dostačuje 30s, delší sekvence vyžadují delší čas (je-li fragment delší než 1500bp, až 90s).

Tyto tři kroky se pravidelně opakují, většinou 20-40×. Po PCR obvykle provádíme kontrolu výsledku elektroforézou na agarózovém, případně polyakrylamidovém gelu.

Přestože je princip PCR velmi jednoduchý, praxe má bohužel často k jednoduchosti daleko, vzhledem k mnoha vzájemně spolupůsobícím faktorům ovlivňujícím konečný výsledek. I pro odborníky v oblasti molekulární biologie občas zůstává záhadou, proč určitý cyklus funguje a jiný ne nebo proč funguje jedna dvojice primerů, zatímco jiná ne. Proto je zpravidla nutno konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů (koncentrace iontů, teplotní režim atd.) empiricky vyzkoušet.

Od objevu základní varianty PCR v osmdesátých letech minulého století byla vyvinuta řada dalších variant (RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RT-PCR (Real-Time PCR), PCR *in situ*, AR-PCR, atd.)<sup>210</sup> i jiné amplifikační metody (3SR, TAS, NASBA, TMA, SDA ap.).

<sup>208</sup> Fologea D. et al „Detecting Single Stranded DNA with a Solid State Nanopore“, Nano Lett., 5, 2005, str. 1905.

<sup>209</sup> **Primer** – v daném případě molekula, která iniciuje syntézu větší molekuly (krátký syntetický kousek DNA)

<sup>210</sup> „Pharmaceutical PCR & Gene Amplification Glossary“, www.genomicsglossaries.com.

Praktický význam polymerázové řetězové reakce je nedozírný. Tím, že dokáže i z nepatrného množství nepurifikované DNA amplifikovat požadovaný úsek DNA, je prakticky nezbytným krokem pro některé další molekulární metody, například pro sekvenování DNA. PCR však také umožňuje jednoduchý a tedy i rychlý a levný screening velkých populačních vzorků. Jestliže nalezneme vhodný segment mitochondriální či jaderné DNA, který vykazuje dostatečnou délkovou proměnlivost (několik málo bází až stovky bází) například v důsledku ztráty krátké sekvence, stačí jednoduchá PCR následovaná agarózovou elektroforézou k získání příslušné informace od stovek jedinců. Jsou-li tyto markery taxonově či populačně specifické, mohou nám posloužit k rychlé identifikaci studovaného vzorku nebo ke studiu hybridních zón mezi taxony<sup>211</sup>; sekvence vázané na pohlavní chromosomy nám zase umožní určit pohlaví. PCR tak umožnila rozšíření molekulárních technik i mezi terénní zoology, ekology a ochranářské pracovníky, u kterých díky své jednoduchosti, relativní levnosti a možnosti analýzy velkého počtu jedinců nachází stále širší uplatnění.

#### 5.1.6.4.3. Metody založené na hybridizaci nukleových kyselin

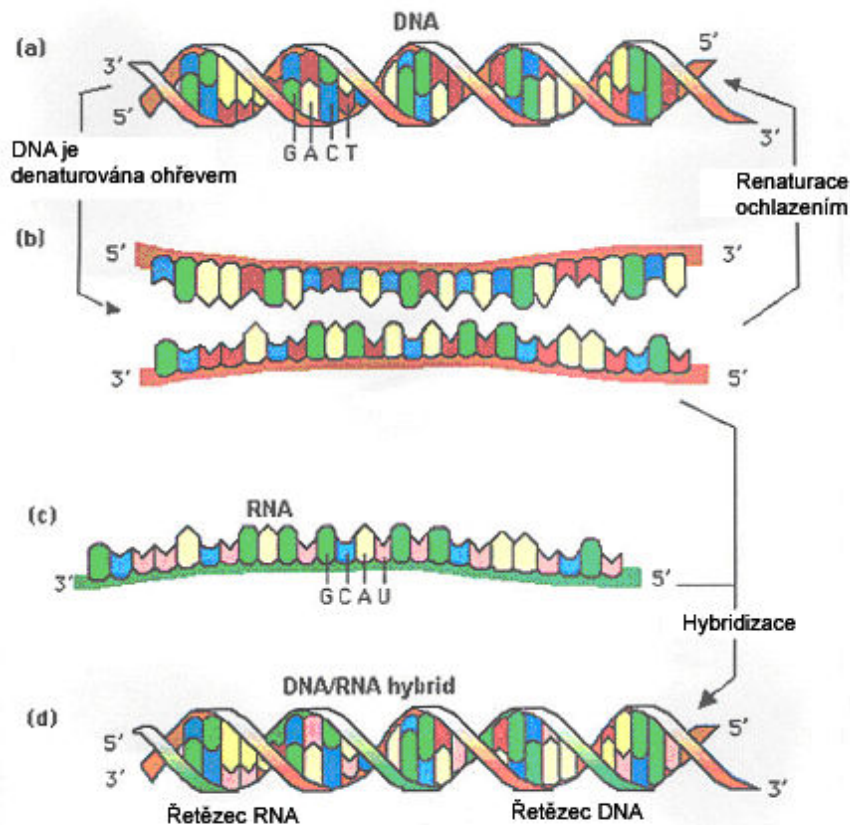
Hybridizační techniky jsou založeny na specifickém spojení komplementárních nukleotidových sekvencí pocházejících z různých molekul nukleových kyselin. Postupnými, na sebe navazujícími kroky jsou denaturace nukleových kyselin (rozdělení dvojvláknové molekuly na *sense* a *antisense* vlákno) a následná renaturace (annealing). Princip spočívá v komplementárním párování vyšetřované DNA a fluorescenčně (nebo jinak) značené **sondy** (krátký úsek nukleové kyseliny o známé sekvenci bází). Výsledný vzorek se hodnotí fluorescenčním mikroskopem. Sonda může být genová (představující sekvenci vyšetřovaného genu), chromozomová (sekvence celého chromozomu) nebo alfa-satelitní (obsahující centromerické či telomerické oblasti chromozomu). Podle technického provedení rozlišujeme hybridizaci v roztocích, hybridizaci na nosičích (templátech) a hybridizaci in situ. Tyto metody se využívají při genové analýze a průkazu mutací. Metodami hybridizace na nosičích jsou **Southern blotting** a **Northern blotting**. Varianta sloužící k detekci specifického proteinu v heterogenní směsi je označována jako **Western blotting**. Hybridizace in situ je významnou metodou molekulární cytogenetiky. Příklad hybridizace DNA – RNA je na **obr. č. 58**.

#### Nutné podmínky pro hybridizaci:

- Sonda i vyšetřovaná DNA musejí být jednovláknové, tj. musejí být před hybridizací denaturovány
- Sonda musí být označena, abychom mohli její vazbu „vidět“ (značení radioaktivitou, enzymem, fluorescencí, luminiscencí)
- Vyšetřovaná DNA musí být přichycena k pevnému podkladu, aby bylo možné odmyt nenavázanou sondu bez omytí vyšetřované DNA
- Hybridizace se sondou obvykle následuje po rozštípání genomové DNA restriční endonukleázou, kdy vzniká velké množství fragmentů, které při rozdělení elektroforézou v gelu vytvoří souvislou šmouhu (smear)
- Hybridizací se v tomto případě detekuje nejen přítomnost určité sekvence nukleotidů, ale také velikost fragmentů, ve kterých se sekvence vyskytuje

---

<sup>211</sup> **Taxon** – skupina konkrétních organismů stejného systémového zařazení existujících v současnosti nebo geologické minulosti, taxonomická jednotka



Obr. č. 58 Hybridizace DNA - RNA

### Některé hybridizační metody:

**ISH** (*in situ* hybridizace) je jednou ze základních metod molekulární cytogenetiky. Dovoluje přesnou identifikaci a lokalizaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA, RNA). Při použití označených specifických sond nukleových kyselin se lokalizují specifické sekvence nukleových kyselin uvnitř neporušených chromozomů, eukaryontních buněk nebo bakteriálních buněk. Pro označení vzorku se zpravidla používá radioizotopů nebo jiných neradioaktivních způsobů.

**FISH** (Fluorescent *in situ* hybridization) je další fluorescenční metoda *in situ* hybridizace. Umožňuje rovněž detekci specifických sekvencí v nukleových kyselinách (DNA, mRNA) *in situ*. Fluorochromy používané pro značení vzorků jsou látky schopné absorpce záření ve formě UV nebo viditelného světla. Tato absorpce způsobí excitaci elektronů v molekulách barviva. Při následném přeskočení zpět na energeticky nižší hladinu dojde k emisi záření o jiné vlnové délce. Dnes je k dispozici více než 100 fluorochromů pokrývajících téměř celé spektrum viditelného světla. Identifikace fluorescenčního signálu je možná přímo z fluorescenčního mikroskopu, citlivější je však analýza na mikroskopu vybaveného výkonnou CCD kamerou, napojenou na počítač se speciálním programem pro FISH. Citlivost metody se zvyšuje o několik řádů. Dalšími variantami metody FISH jsou metody **mFISH** (mnohobarevný FISH) a **mBAND** (FISH s parciálními sondami). Metoda FISH se používá zejména v klinické cytogenetice při<sup>212</sup>:

<sup>212</sup> Michalová K., Zemanová Z. „Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi“, Klin. Biochem. Metab., 13 (34), 2005, č. 2, str. 63

- studiu karyotypu<sup>213</sup> buněk v metafázi nebo interfázi a lokalizace genů
- početním určování a přesné identifikace strukturních chromozomových odchylek a marker chromozomů
- mapování genů a DNA sekvencí
- detekci minimální reziduální doby choroby nebo časném relapsu (zvrát choroby k předešlému horšímu stavu) u leukémií a zhoubných nádorů
- monitorování výsledků chemoterapie nebo transplantace kostní dřeně u nemocných s leukémiemi
- detekci buněk, které jsou zahrnuty v neoplastickém procesu

Praktické příklady použití metody FISH lze nalézt v<sup>214</sup>

**CGH** (komparativní genomová hybridizace) – umožňuje např. vyšetřením nádorových buněk zjistit přírůstek nebo ztrátu (amplifikaci nebo delecí) genetického materiálu na všech chromozomech

**SKY** (spektrální karyotypování) – umožňuje současnou vizualizaci všech lidských chromozomů. Je to metoda vhodná zejména pro identifikaci translokací (přemísťování určitých fragmentů chromozomů na jiný chromozom).

#### Další metody

Používá se řada dalších metod založených na hybridizaci nukleových kyselin. Mimo DNA mikrosouborů (viz následující podkapitola) se používá skupina metod, které můžeme zahrnout pod pojem „Restrikční analýzy“. Jsou to např. Southernův přenos (Southern blotting), restrikční mapy, DNA otisky aj. Hybridizace se používá i v další významné oblasti - při studiu polymorfismů v DNA, např. SNP (single nucleotide polymorphism), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), RFLP (Restriction fragment length polymorphism), STRs (Short tandem repeats).

#### **5.1.6.5. Uspořádané mikrosoubory (microarrays)**

Mikrosoubory různých biologických materiálů, zejména DNA-mikrosoubory (též DNA-čipy), jsou jedním z nejpozoruhodnějších výsledkem bouřlivého vývoje metod molekulární genetiky. Postupně nahrazují stále ještě používané makrosoubory. Jak je uvedeno výše, tradičně se nukleová kyselina zkoumá na přítomnost určité sekvence sondou tak, že se vyšetřovaná nukleová kyselina přichytí na pevný podklad a provede se hybridizace s konkrétní sondou, následovaná detekcí sondy. Takto lze jedním poměrně zdoluhavým postupem zjistit přítomnost jedné konkrétní sekvence v každém vyšetřovaném vzorku nukleové kyseliny. Pokud je vyšetřovaná nukleová kyselina dobře přichycená k podkladu (membráně), je sice možné postup opakovat, ale efektivita je i tak velmi nízká. Pro zvýšení produktivity analýz byly postupně vyvinuty různé typy makrosouborů a později mikrosouborů, nejen pro analýzu DNA, ve kterých je na malé ploše umístěno velké množství sond. V současné době se používá mnoho druhů mikrosouborů, např.<sup>215,216</sup>:

- DNA mikrosoubory<sup>217</sup>
- Proteinové mikrosoubory<sup>218</sup>

<sup>213</sup> **karyotyp** - soubor chromozomů jádra tělní buňky charakteristický pro určitý druh organismu

<sup>214</sup> Kodet R. et al „Život patologa mezi molekulami – výstroj a výzbroj pro přežití“, Klinická onkologie, 17, 1/2004, str.3., [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).

<sup>215</sup> „Pharmaceutical Microarrays & Protein Chips Glossary“, [www.genomicglossaries.com](http://www.genomicglossaries.com)

<sup>216</sup> Martinsky T. „Microarrays: Not Just for Genomics Anymore“, Microarray technology, 9/2004. str. 12.

<sup>217</sup> Debouck Christine, Goodfellow P.N. „DNA Microarrays in Drug Discovery and Development“, Nature Genetics, 21, 1999, str. 48.

<sup>218</sup> MacBeath „Protein Microarrays and Proteomics“, Nature Genetics, 32, 2002, str. 526.

- Oligonukleotidové mikrosoubory<sup>219</sup>
- CGH mikrosoubory<sup>220</sup>
- Mikrosoubory protilátek
- Genomické mikrosoubory
- Glykoproteinové mikrosoubory
- Karbohydrátové mikrosoubory<sup>221</sup>
- Buněčné mikrosoubory<sup>222</sup>
- Mikrosoubory malých molekul<sup>223</sup>
- Mikrosoubory tkání<sup>224</sup>

Termín „mikrosoubor“ se původně používal pro mikrosoubory teček cDNA. Nyní se používá v mnohem širším smyslu. První DNA-mikrosoubory byly vyvinuty v roce 1995 zejména P.O. Brownem a spolupracovníky ze Stanford University<sup>225</sup>.

#### 5.1.6.5.1. DNA mikrosoubory

Funkci mikrosouboru si stručně vysvětlíme na příkladě DNA-mikrosouboru. Na **obr. č. 59** je schéma postupu při diferenciální genové expresi za použití DNA-mikrosouboru. Srovnávací hybridizační experiment zahrnuje izolaci mRNA ze dvou oddělených vzorků (A). mRNA z každého vzorku je zpracována reverzní transkriptázou (B) a označena odlišnými fluorescenčními značkami (C). Oba roztoky s označenými RNA se smísí a hybridizují na DNA mikrosouboru obsahujícího mnoho tisíců nebo desetitisíců sekvencí, buď genomů nebo cDNA sekvencí. Následuje vymytí nenavázaných sekvencí (D). Mikrosoubor je poté skenován na fluorescenčním konfokálním skeneru, přičemž se určuje barva každé tečky (E). V daném příkladě jsou červené geny po expresi vzorku A, geny po expresi vzorku B jsou zelené a ty geny, jež reagovaly v obou vzorcích jsou žluté. To dovoluje určit geny, které specificky reagují na odezvu určité nemoci ap.

DNA mikrosoubor, obsahující fragmenty DNA, se vytváří na neporézní pevné podložce (sklo, nylonová membrána, křemíková destička). DNA-mikrosoubory dělíme na s nízkou hustotou bodů (200-5000 genů), se střední hustotou bodů (5000-10000) genů a vysokou hustotou bodů (nad 10000 genů). Např. úplný genom kvasnic (cca 6000 genů) byl umístěn na jednom mikrosouboru. Sondy (sekvence DNA) se vytvářejí různými technologiemi (metoda používaná při stříkání inkoustu v tiskárnách, fotolitografie, mikrosplotting aj.). Používají se i různé detekční metody: fluorescence<sup>226</sup> (převážně), kolorimetrie, chemiluminiscence, povrchová plasmonová rezonance (SPR), hmotová spektrometrie<sup>255</sup>, magnetismus<sup>227</sup>. V současné době je výroba mikrosouborů komercializovaná. Na trhu jsou jak připravené

<sup>219</sup> Lipshutz R.L. et al „High Density Synthetic Oligonucleotide Arrays“, Nature Genetics, 21, 1999, str. 20.

<sup>220</sup> Pinkel D, Altberson D.G. „Array Comparative Genomic Hybridization and its Application in Cancer“, Nature Genetics, 37, 2005, str. 511.

<sup>221</sup> Houseman B.T., Mrkish M. „Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification“, Chem. Biol., 9, 2002, str. 443.

<sup>222</sup> Wheeler D.B. et al „Cell Microarrays and RNA Interference Chip Away at Gene Function“, Nature Genetics, 37, 2005, str. 525.

<sup>223</sup> Kuruvilla F.G. et al „Dissecting Glucose Signalling with Diversity-oriented Synthesis and Small-molecule Microarrays“, Nature, 416, 2002, str. 653.

<sup>224</sup> Kononen J. et al „Tissue Microarrays for High-throughput Profiling of Tumor Specimens“, Nat.Med., 4, 1998, str. 844.

<sup>225</sup> Schena M, Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. „Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray“, Science, 270, 1995, str. 467.

<sup>226</sup> „The Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies“, 10th Web Edition, 2006, <http://probes.invitrogen.com/handbook/>

<sup>227</sup> Megens M., Prins M. „Magnetic Biochips: A New Option for Sensitive Diagnostics“. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293, 2005, str. 702.

DNA-mikrosoubory, tak automatická zařízení pro jejich přípravu<sup>228</sup>. Např. GeneChip<sup>®</sup> společnosti Affymetrix Inc. oáahuje až 6,5 mil. sond.<sup>229</sup>

Co technologie DNA čipů umožňuje a jaké jsou oblasti jejího využití?

Tato technologie umožňuje sledovat velké množství informací o primární struktuře (sekvenci) a přítomnosti počtu (kopií) molekul DNA. Lidský genom je tvořen 3 miliardami deoxyribonukleotidů, které kódují zhruba 35 tisíc genů. Jednotlivé geny jsou v jednotlivých tkáních a v různých stavech aktivní kvalitativně i kvantitativně v nestejně míře. To, co nás zajímá, je schopnost rozeznat odlišnosti genové aktivity (genové exprese) v průběhu vývoje, v procesech reakce buňky na vnější prostředí, ve stavech fyziologické normy a patologie apod.

Například mezi genovou expresí v normální tkáni a v tkáni, která se vydala cestou nádoru<sup>230</sup>. Nebo odlišnost genové exprese tkáně v období předcházejícím metastázám a po něm. Geny se změněnou aktivitou expresí jsou logickým cílem dalšího studia, jehož výsledkem může být odhalení včasných markerů onemocnění nebo potenciálních cílů terapeutického ovlivnění.

To je tedy jeden způsob využití - DNA mikrosoubory pro studium genové exprese. Jiný způsob využití mikrosouborů umožňuje paralelní detekci velkého počtu (tisíců) známých mutací nebo polymorfismů. Dnes se provádí celá řada studií, v nichž jsou vyhledávány polymorfismy DNA vhodné k detekci a sledování vybraných oblastí genomu. Dostupnost mikrosouborů pro analýzu těchto polymorfismů umožňuje rozsáhlé studie - například dobře klinicky definované skupiny dvou tisíc pacientů s kardiovaskulárními chorobami ve srovnání s kontrolním souborem. Uplatnění nachází mikrosoubory i ve farmakogenomice. DNA čipy jsou používány pro vyhledávání mechanismů nežádoucích účinků léků a k identifikaci genetických dispozic předurčujících určité skupiny pacientů ke specifické léčbě (zpřesnění vhodnosti či nevhodnosti léku nebo jejich kombinací vzhledem ke genotypu pacienta). To postupně vede ke značnému posunu v celém farmaceutickém průmyslu, zejména k urychlení a zpřesnění všech fází klinických studií a k možnosti cílené léčby v klinické praxi. Dalšími oblastmi, které technologie DNA mikrosouborů významně ovlivňují, jsou imunologie, mikrobiologie a virologie. Touto cestou by mělo dojít především k usnadnění diagnostiky profilů virů a bakterií - řádově během několika hodin. K dispozici jsou již mikrosoubory pro detekci stovek různých virů, bakterií atd.

#### 5.1.6.5.2. Nanosoubory

Do technologie mikrosouborů vstupují poslední době i nanotechnologie:

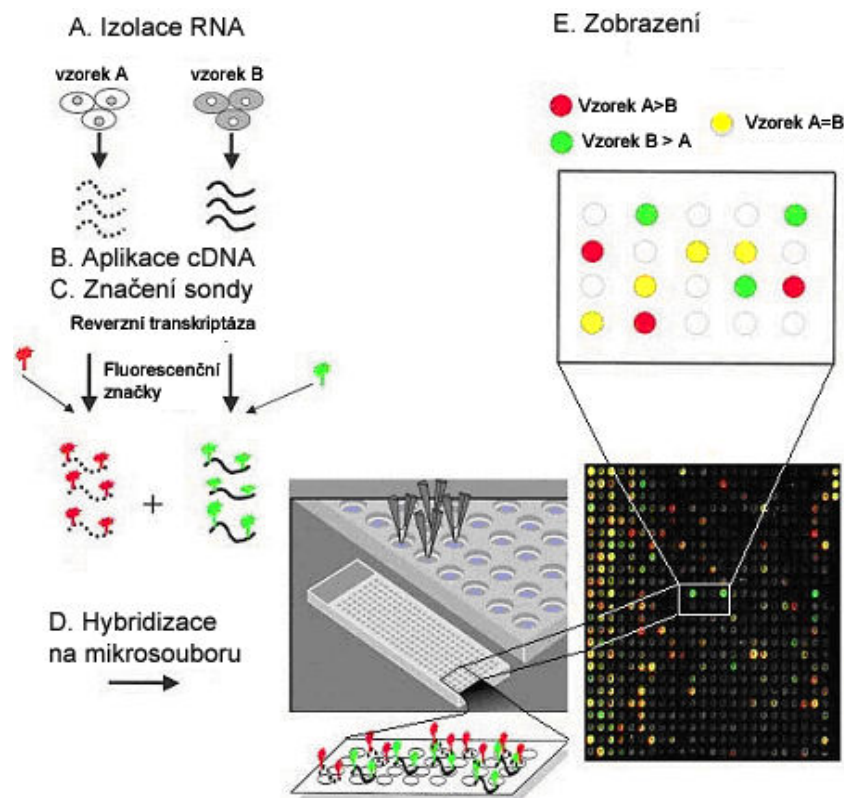
- V roce 2000 publikovali M.J.Heller et al článek o konstrukci mikroelektronického čipu obsahujícího řízené elektroforetické pole pro mnohonásobnou DNA hybridizaci a jiné genomické aplikace. Čip obsahoval planární soubor mikroelektrod a bylo na něm možné vytvořit elektrická pole dovolující elektroforeticky transportovat nabitě molekuly (DNA, RNA, proteiny, enzymy, protilátky atd.) z jakéhokoliv místa povrchu zařízení. Klíčovým prvkem funkce zařízení byla prostupná nanovrstva pokrývající mikroelektrody (porézní hydrogel). Vrstva umožňovala dopravu molekul vody a malých iontů, ale blokovala transport větších molekul. Sloužila jako porézní podložka pro DNA sondy a jiné molekuly v souboru. Elektroforetické pole umožnilo zrychlenou DNA hybridizaci<sup>231</sup>.

<sup>228</sup> [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com), [www.agilent.com](http://www.agilent.com), [www.tecan.com](http://www.tecan.com), [www.quantabiotech.com](http://www.quantabiotech.com), atd.

<sup>229</sup> Ragoussis J., Gareth E. „Affymetrix Gene Chip<sup>®</sup> System: Moving from Research to the Clinic“, Expert Review of Molecular Diagnostics, 6, 2006, str. 145

<sup>230</sup> Pospíšilová S., Mayer J. „DNA-čipy – moderní metoda analýzy diferenciální genové exprese a její význam pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění“, Časopis lékařů českých, 144, 2005, str. 11.

Popsaný systém nabízí firma Nanogen, Inc. pod značkou NanoChip® 400 System<sup>232</sup>.



**Obr. č. 59** Schéma postupu při diferenciální genové expresi za použití DNA-mikrosouboru

- **NTNFET** (Carbon Nanotube Network Field-effect Transistors) – mikrosoubor polem řízených tranzistorů s jedostěnnými uhlíkovými nanotrubicemi vytvořili A. Star et al.<sup>233</sup>. Zařízení s imobilizovanými syntetickými oligonukleotidy bylo schopné specificky rozeznávat cílové sekvence DNA.
- V laboratoři C.A. Mirkina bylo provedeno zkoumání virů ve vzorcích lidské krve. Prokázalo se, že virus HIV-1, lze detekovat pomocí nanosouborů protilátek<sup>234</sup>. Pro vytvoření nanosouboru 16-merkaptohexadekanoidní kyseliny ve formě soustavy teček o velikosti 60 nm na tenkém filmu zlata byla využita nanolitografie s ponorem pera (dip-pen nanolithography). Monoklonální protilátky antigenu p24 viru HIV-1 byly znehybněny na tečkách. Analýza sestávala z ponoření souboru na jednu hodinu do vzorku krevní plazmy. Následně byl signál z nanosouboru s vázaným antigenem zesílen pomocí sond nanočástic zlata, které byly funkcionalizovány polyklonálními protilátkami v roztoku. Bylo možné změřit množství antigenu p24 viru HIV-1 v krevní plazmě u lidí s méně než 50 kopiemi RNA/ml, což ukazuje, že vzorky na nanometrické úrovni mohou daleko překročit limit detekce 5 pg/ml, který se vyskytuje u klasických imunisorbentních rozborů bez cíleného zesílení. Biodetekce na bázi nanosouborů by mohla pomoci diagnostikovat virus HIV-1 při přenosu z matky na dítě.

<sup>231</sup> Heller M.J. et al „Active Microelectronic Chip Devices which Utilize Controlled Electrophoretic Fields for Multiplex DNA Hybridization and Other Genomic Application“, *Electrophoresis*, 21, 2000, str. 157.

<sup>232</sup> www.nanogen.com

<sup>233</sup> Star A et al „Label-free Detection of DNA Hybridization Using Carbon Nanotube Network Field-effect Transistors“, *PNAS*, 103, 2006, str. 921.

<sup>234</sup> Lee K.B. et al „The Use of Nanoarrays for Highly Sensitive and Selective Detection of Human Immunodeficiency Virus Type I in Plasma“, *Nano Lett.*, 4, 2004, str. 1869.



## 5.2. NANOBIOSENZORY

Biosenzory se staly samostatnou oblastí molekulární biotechnologie (viz podkapitola 2.7.). Technologie biosenzorů spojuje poznatky biologie s pokroky v mikroelektronice. Biosenzor sestává obvykle ze tří částí: biologického prvku (např. buňky, enzymu, DNA nebo protilátky), rozhraní a převodníku velmi malých rozměrů. Biologický prvek specificky detekuje přítomnost látky, která má být zjištěna, rozhraní (polymerový tenký film, chemicky modifikovaný povrch) spojuje biologický prvek s převodníkem. Převodník, přeměňující biochemický signál na elektrický nebo optický, úměrný koncentraci detekované látky, je zařízení, které je napájeno jedním systémem a které napájí druhý systém energií, obvykle jiné formy.

Předmětem intenzivního výzkumu v současné době jsou **nanobiosenzory**, zařízení, jejichž rozměry se pohybují v nanometrické škále. Nanosenzory by se mohly stát nástroji, které by vyšetřovaly důležité biologické procesy na buněčné úrovni *in vivo*.

Existují tři typy nanosenzorů, u kterých se předpokládá jejich využití např. v lékařství. Jsou to senzory s nosníkovým uspořádáním, nanotrubicové senzory a nanodrátové senzory.

### 5.2.1. SENZORY S NOSNÍKOVÝM USPOŘÁDÁNÍM

Senzory s nosníkovým uspořádáním vyrobené na mikrometrické úrovni se používají jako mimořádně citlivé mechanické senzory, které přeměňují (bio) chemické nebo fyzikální procesy na zaznamatelný (elektrický) signál v mikroelektromechanických systémech (MEMS) nebo v nanoelektromechanických systémech (NEMS). MEMS konzolové nosníky (cantilevers) jsou obvykle křemíkové tyče obdélníkového tvaru o tloušťce cca 1  $\mu\text{m}$  a bývají uspořádány do souborů. NEMS konzolové nosníky jsou menší, s rozměry od několika set nm do několika nm. Jediným rysem konzolových nosníků je jejich schopnost se ohýbat vlivem molekulární adsorpce nebo změn v povrchovém napětí, které indukují ohyb. Hlavní výhodou takových miniaturních senzorů je jejich malá velikost, rychlá doba reakce, vysoká citlivost a přímá transdukce, aniž by bylo potřeba jiných označení.

Nosníky mohou pracovat ve třech v základech se lišících módech<sup>235</sup>:

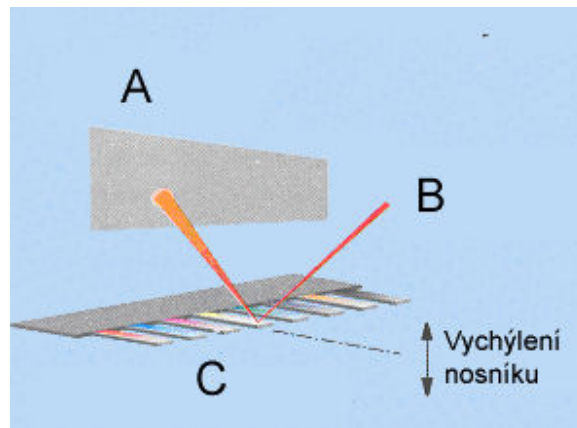
- Statickém módu, při kterém je měření výchylky založeno na změnách napětí indukovaném molekulárními interakcemi na povrchu nosníku<sup>236</sup>. Horní povrch nosníku je obvykle povlečen vrstvou titanu a/nebo zlata několik nm tlustou, která poskytuje reflexní povrch a mezifázi pro připevnění funkčních skupin zkoumaných molekul. Výchylka nosníku je detekována laserem.
- Dynamickém módu, při kterém prodělává nosník excitaci v jeho základním vibračním módu a měří se změna rezonanční frekvence závislá na zatížení nosníku<sup>237</sup>.
- V módu ohřevu bimetalu způsobují výchylku rozdíly v lineárním koeficientu tepelné roztažnosti materiálu nosníku. Např., krystalický křemík se 100 nm tlustou kovovou vrstvou aplikovanou na jeden povrch způsobuje výchylku nosníku při aplikaci tepla. Tepelné změny v řádu  $10^{-5}$  K způsobují výchylky o velikosti několika nm, což může být snadno měřeno.

Schéma uspořádání senzoru s nosníkovým uspořádáním je na **obr. č. 60**.

<sup>235</sup> Lang H.P., Hegner M., Gerber C. „Cantilever Array Sensors“, *Materialstoday*, 5/2005, str. 30.

<sup>236</sup> Fritz J. et al „Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics“, *Science*, 288, 2000, str. 316.

<sup>237</sup> Battiston F.M. et al „A Chemical senzore and Actuators Based on a Microfabricated Cantilever Array with Simultaneous Resonance-frequency and Bending Readout“, *Sensors andnevyhasínají Actuators*, B 77, 2001, str. 122.



**Obr. č. 60** Schéma uspořádání senzoru s nosíkovým uspořádáním  
 A – citlivý lineární detektor polohy; B – lasery (jeden na každý nosník);  
 C – soubor nosníků (každý je jinak povlečen)

### 5.2.1.1. Umělý nos

M.K.Baller et al vyvinuli v roce 2000 zařízení, které nazvali „Nanotechnologický čichový senzor - NOSE“<sup>238</sup>. Zařízení mělo charakterizovat těkavé páry a pachy. Pro mikrovýrobu souboru nosníků byl použit křemík vyleptaný na izolátoru. Čip sestával z osmi nosníků, každý byl o délce 500 $\mu$ m, o šířce 100  $\mu$ m a tloušťce 500 nm. Rozteč mezi nosníky byla 250  $\mu$ m. Horní povrch nosníků byl povlečen 2 nm vrstvou Ti a 20 nm vrstvou Au. Výchytky nosníků byly stanovovány osmi lasery uspořádanými podle rozteče. Na povlaku nosníků byla ještě aplikována vrstva polymeru. Detekce plynů probíhala prostřednictvím difuze molekul plynu do polymeru, což mělo za následek jeho bobtnání a statický ohyb nosníků. Zařízení je schopné rozpoznat jednoduché nebo komplexní pachy. Hlavní výhodou umělého nosu je, že se neunaví, výsledky jsou reprodukovatelné a nos může být umístěn i do prostředí, které je škodlivé pro člověka. Je třeba poznamenat, že umělý nos rozpoznával jen dříve analyzované pachy, a proto jej lze používat spíše jako zařízení pro charakterizaci a ne pro analytické účely.

### 5.2.1.2. Detekce bakterií, plísní a virů

Byla rovněž vyvinuta zařízení pro detekci bakterií<sup>239</sup>, zárodků plísní<sup>240</sup> a virů<sup>241</sup>. Interakce mezi specifickými protilátkami, například protilátkami proti *E. coli*, které jsou znehybněny na povrchu nosníku, a antigeny na povrchu buněčných membrán má za následek zvýšení hmotnosti, které je přístrojem detekováno. Citlivost detekce se pohybuje v řádu jedné bakterie, což odpovídá hmotnosti  $\sim 1$  pg, jedné spóry plísně, jediné částice viru kravských neštovic, která odpovídá hmotnosti  $\sim 10$  fg. Soupravy konzolových nosníků umožňují detekovat živé funkcionalizované spóry plísní *in situ* v průběhu  $\sim 4$  hodin, což je více než desetkrát rychleji než u procesů detekce plísní, které se používá v současné době. Nedávno bylo vyvinuto zařízení na principu NEMS, které rozeznává na molekulární úrovni částice virů, což vede ke zlepšení citlivosti, přičemž lze detekovat až 6 vázaných částic baculoviru<sup>242</sup>.

<sup>238</sup> Baller M.K. „A Cantilever Array-based Artificial Nose“, *Ultramicroscopy*, 82, 2000, str.1.

<sup>239</sup> Ilie B. et al „Single Cell Detection with Micromechanical Oscillators“, *Nanometer Struct.*, 19, 2001, str. 2825.

<sup>240</sup> Nugaeva N. et al „Micromechanical Cantilever Array Sensors for Selective Fungal Immobilization and Fast Growth Detection“, *Biosens. Bioelectron.*, 21, 2005, str. 528.

<sup>241</sup> Gupta A. et al „Single Virus Particle Mass Detection Using Microresonators with Nanoscale Thickness“, *Appl. Phys. Lett.*, 84, 2004, str. 1976.

<sup>242</sup> Illie B. et al „Virus Detection Using Nanoelectromechanical Devices“, *Appl. Phys. Lett.*, 83, 2004, str. 2604.

### 5.2.1.3. Další příklady

Výzkum a aplikace senzorů s nosníkovým uspořádáním je velmi aktivní<sup>230,243</sup>. Odborná literatura z poslední doby obsahuje např.:

- Biochemické aplikace při použití statického módu v tekutinách (např. jako senzor glukózy)<sup>244</sup>
- Detektor *E.coli*<sup>245</sup>
- Biomolekulární analýza prostřednictvím dvourozměrných souborů mikronosníků<sup>246</sup>

Závěrem je možné konstatovat, že sensorová technika souborů mikronosníků dovoluje studium procesů chemisorpce a fyzisorpce, jakož i stanovení materiálově specifických vlastností, např. změny entalpie v průběhu fázové transformace. Experimenty prováděné v tekutém prostředí poskytují nové pohledy na komplexní biochemickou reakci jakou je hybridizace DNA, na molekulární rozpoznávání v systému protilátka – antigen nebo na proteomiku. Úkolem zůstává zvýšení citlivosti mikronosníkových systémů a jejich dlouhodobá stabilita.

## 5.2.2. SENZORY NA BÁZI NANOTRUBIC

Senzory na bázi **uhlíkových nanotubic** jsou středem velké pozornosti (viz též podkapitola 5.3.2.2.). Mohou se stát nadějnými kandidáty např. jako senzory, které monitorují glukózu v krvi a v moči. MWCNT a také SWCNT byly použity k vývoji enzymatických amperometrických biosenzorů<sup>247</sup> nebo k vývoji fluorimetrických biosenzorů<sup>248</sup>. Enzym glukózy oxidáza je buď znehybněn uvnitř MWCNT nebo je připojen pomocí nekovalentní vazby k povrchu SWCNT, čímž umožňuje katalýzu glukózy s peroxidem vodíku ve formě vedlejšího produktu. U amperometrického biosenzoru umožňuje znehybnění enzymu přímý přenos elektronů z enzymu na zlatý nebo platinový přenašeč, který pak jako odezvu generuje elektrický proud. Fluorescenční biosenzor by mohl být použit v novém typu biologického senzoru, který lze implantovat, jako je například nanometrický senzor blízkého infračerveného pásma. Tento senzor lze vložit do tkáně, lze ho excitovat pomocí laserového ukazatele a zajistit tak trvalé monitorování úrovně glukózy v krvi v reálném čase. Skládá se ze SWCNT zapouzdřených do proteinu, které jsou funkcionalizovány krevní žlutou solí, což je látka, která je citlivá na peroxid vodíku. Iont kyanoželeznanu adsorbuje na povrchu prostřednictvím porézní monovrstvy. Je-li přítomen peroxid vodíku, vytvoří s iontem celek, který změní hustotu elektronů uhlíkové nanotrubic a následně nato i její optické vlastnosti. Čím více glukózy je přítomno, tím jasněji bude uhlíková nanotrubička světélkovat. Senzor může být naložen do porézní kapiláry a vložen do tkáně. Jelikož uhlíkové nanotrubičky

<sup>243</sup> Lavrik N.V. et al „Cantilever Transducers as a Platform for Chemical and Biological Sensors“, Rev Sci. Instr., 75, 2004, str. 2229.

<sup>244</sup> Zhang Y. et al „Micromechanical Measurement of Membrane Receptor Binding for Label-free Drug Discovery“, Biosensors and Bioelectronics, 19, 2004, str. 1473.  
Yan X. et al „Modification of Microcantilevers Using Layer-by-layer Nanoassembly Film for Glucose Measurement“, Chem. Phys. Lett., 390, 2004, str. 34.

<sup>245</sup> Zhang J., Ji H.-F. „An Anti *E.coli* O157:H7 Antibody-immobilized Microcantilever for the Detection of *Escherichia Coli*“, Analytical Sciences, 20, 2004, No. 4, str. 585

<sup>246</sup> Lin M.-Y. et al „A 2-D Microcantilever Array for Multiplexed Biomolecular Analysis“, Journal of Microelectromechanical Systems, 13, 2004, str. 290.

<sup>247</sup> Joshi P.P. et al „Amperometric Biosensors Based on Redox Polymer-carbon Nanotube-enzyme Composites“, Anal. Chem., 77, 2005, str. 3183.

<sup>248</sup> Barone F.W. et al „Near-infrared Optical Sensors Based on Single-walled Carbon Nanotubes“, Nature Mater., 4, 2004, str. 86.

nevyhasínají jako organické molekuly, které světélkují, byly by tyto optické senzory ve formě nanočástic vhodné k dlouhodobému monitorování. Byly prováděny průkazní studie, při kterých byla zjišťována úroveň glukózy *in vitro*, tj. ve vzorcích krve. Praktické využití těchto nanotrubic se očekává za pět až deset let<sup>243</sup>.

Samosestavené **peptidové nanotrubic** mohou být využity v elektrochemických senzorech<sup>249</sup>. Začleněním peptidových nanotrubic se několikrát zlepšuje citlivost zařízení. Peptidové nanotrubic mají ve srovnání s uhlíkovými nanotrubicemi několik výhod, jelikož jsou biokompatibilní, rozpustné ve vodě, levné, je snadné je vyrobit a lze je chemicky upravovat tím, že se zaměříme na jejich amino nebo karboxylové skupiny. Techniku snímání lze využít jako základnu pro mimořádně citlivou detekci biologických a chemických činidel.

### 5.2.2.1. Senzory na bázi nanotrubic pro detekci DNA

Soustavy nanoelektrod na bázi MWCNT vsazené do matrice SiO<sub>2</sub> byly začleněny do elektrochemického systému pro mimořádně citlivou a rychlou detekci DNA<sup>250</sup>. K výrobě jednotlivě adresovaných řad nanoelektrod byla použita metoda bottom-up a výsledkem byly přesně umístěné a dobře uspořádané řady MWCNT na křemíkové destičce. Otevřené konce MWCNT byly následně funkcionalizovány pomocí oligonukleotidových sond. Kombinováním řad nanoelektrod s oxidací guaninu lze voltametrickým měřením snadno detekovat hybridizaci méně než několika attomolů oligonukleotidů jakožto cílů (~ 3,5 x 10<sup>6</sup> molekul DNA). Funkčnost této koncepce byla předvedena u klinicky významných molekul DNA, které se vztahují k alelám divokého typu, jež jsou spojovány s geny rakoviny. Další optimalizací systému by bylo možné dosáhnout přesnosti detekce pod jeden attomol.

### 5.2.2.2. Senzory na bázi nanotrubic pro kapnografii

Senzory pro chemické plyny na bázi uhlíkových nanotrubic představují pro lékařské využití velký potenciál. Společnost Nanomix Inc. (Emeryville, Kalifornie, USA) v současné době vyvíjí senzor pro lékařskou kapnografii a využívá přitom uhlíkových nanotrubic povlakovaných polyetyleniminem. Kapnografie je měření koncentrace oxidu uhličitého v lidském dechu a je indikátorem stavu pacienta v průběhu podávání anestetik. Drobný senzor s malým výkonem bude prvním elektronickým senzorem pro kapnografii určeným k jednomu použití a jeho potenciál spočívá v tom, že bude kvantitativně rozšířeno monitorování dýchání mimo operační sál a také do místností ambulancí a pohotovosti a rovněž i do místností pro lékaře<sup>251</sup>.

### 5.2.2.3. Další biosenzory na bázi uhlíkových nanotrubic

Byly uveřejněny informace i o dalších aplikacích, což jen ilustruje široký potenciál biosenzorů na bázi uhlíkových nanotrubic; jsou to například platformy pro biosnímání a simultánní detekci dopaminu a kyseliny askorbové za účelem stanovení diagnózy Parkinsonovy choroby<sup>252</sup>, pro zjištění dopaminu a serotoninu<sup>253</sup> a rovněž i biosenzory pro detekci radikálu oxidu dusnatého<sup>254</sup>.

<sup>249</sup> Yemini M. et al „Novel Electrochemical Bioensing Platform Using Self-assembled Peptide Nanotubes“, Nano Lett., 5, 2005, str. 183.

<sup>250</sup> Li J. et al „Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection“, nano Lett., 3, 2003, str. 597.

<sup>251</sup> www.nano.com

<sup>252</sup> Jiang L. et al „A Chitosan-multiwall Carbon Nanotube Modified for Simultaneous Detection of Dopamine and Ascorbic Acid“, Anal. Sci., 20, 2004, str.1055.

<sup>253</sup> Wu K. et al „Simultaneous Determination of Dopamine and Serotonin on a Glassy Carbon Electrode Coated with a Film of Carbon Nanotubes“, Anal. Biochem., 318, 2003, str. 100.

### 5.2.3. SENZORY NA BÁZI NANODRÁTŮ

Rovněž senzory využívající nanodrátů jsou předmětem rozsáhlého vývoje<sup>254</sup>. Jsou to především senzory řízené polem s nanodrátů funkcionalizovanými specifickými povrchovými receptory, které mohou pracovat v roztoku. Umožňují přímou přeměnu elektrického signálu bez nutnosti označení zkoumaného vzorku, a to v reálném čase. Mají velmi vysokou citlivost, rozlišitelnost a potenciál pro integraci do mikrosouborů. Následující příklady popisují jejich schopnosti při detekci proteinů, virů, DNA a při analýze vazby malých molekul k proteinům, což má velký význam při vývoji léků i v mnoha oblastech biologie.

#### 5.2.3.1. Elektrická detekce jednotlivých virů na bázi nanodrátů

Polovodičové křemíkové nanodrátů mohou být sestaveny jako transistory řízené polem (FET) za účelem elektrické detekce virů v roztocích<sup>255</sup>. Když se jednotlivý nabitý virus naváže k receptorům (např. k protilátkám) připojeným k nanozařízení, vodivost polovodičového nanodrátů se změní ze základní hodnoty, a když se virus odpoutá, vodivost se vrátí na původní hodnotu. Vodivost jiného zařízení bez receptorů, by měla být během měření beze změn. To slouží jako vnitřní kontrola. Potenciál elektrické detekce virů na bázi nanodrátů rozšiřuje možnosti jiných metod, například PCR a mikromechanických zařízení.

#### 5.2.3.2. Elektrická detekce biomolekul na bázi nanodrátů

Zařízení s FET transistory na bázi křemíkových nanodrátů byly využity pro detekci inhibitorů malých molekul vazby ATP k Abl, což je protein kináza, který svou činností zodpovídá za vznik chronické myelogenní leukemie<sup>256</sup>. Kromě toho lze také provést bez označování detekci DNA a směsí DNA v reálném čase<sup>257</sup>. Senzory s křemíkovými nanodrátů, které jsou funkcionalizovány pomocí receptorů peptidové nukleové kyseliny, mohou odlišit divoký typ od typu mutace transmembránového receptoru u cystické fibrózy. Cystická fibróza je jedním z nejběžnějších zhoubných genetických onemocnění v populaci evropského původu.

### 5.2.4. BIO-BAR CODE ASSAY (biologický čarový kód)

Jedním z hlavních nedostatků klasických metod detekce proteinů nebo antigenů (tj. např. ELISA nebo Southern blotting) je relativní necitlivost vůči targetu. Pro vyšetření pacientů a stanovení diagnózy včasného stádia onemocnění je potřeba mít vysoce citlivé testy, které umožňují detekovat velmi nízké koncentrace patogenních biomarkerů, a tím definitivně potvrdit onemocnění u žijících pacientů. Nedávno byl vyvinut vysoce citlivý test nazvaný „bio-bar code assay“, který je určen k detekci analytů protein/antigen při klinicky relevantních attomolárních koncentracích, detekci proteinů a DNA targetů. Koncentrace analyzovaných látek které mohou být řádově pětikrát až šestkrát nižší ve srovnání s klasickými klinickými testy<sup>258</sup>. Při testu se používají dva typy sond: sondy nanočástic zlata (o průměru 13 – 30 nm), které jsou silně funkcionalizovány stovkami identických hybridizovaných oligonukleotidů

<sup>254</sup> Patolsky F, Lieber C.M. „Nanowire Nanosensors“, *Materialstoday*, 8, 4/2005, str. 20.

Samuelson L. „Self-forming Nanoscale Devices“, *Materialstoday*, 7, 6/2004, str. 26.

<sup>255</sup> Patolsky F. et al „Electrical Detection of Single Viruses“, *PNAS*, 101, 2004, str. 14017.

<sup>256</sup> Wang W.U. et al „Label-free Detection of Small Molecule-protein Interactions by Using Nanowire Nanosensors“, *PNAS*, 102, 2005, str. 3208.

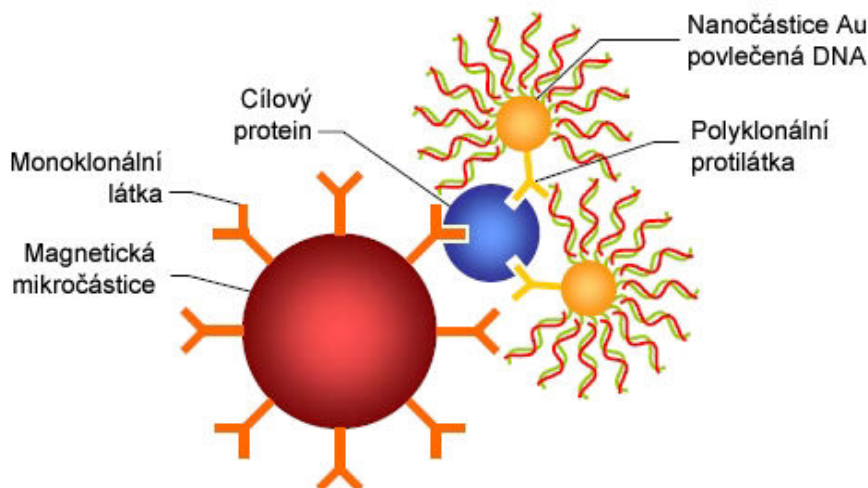
<sup>257</sup> Hahn J.I., Lieber C.M. „Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variation Using Nanowire Nanosensors“, *Nano Lett.*, 4, 2004, str. 51.

<sup>258</sup> Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A. „Nanoparticles-based Bio-bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins“, *Science*, 301, 2003, str. 1884.

Thaxton C.S. et al „A Bio-Bar-Code Assay Based upon Dithiothreitol-Induced Oligonucleotide Release“, *Anal. Chem*, 77, 2005, str. 8174.

(řetězce DNA neboli „DNA s čarovým kódem“ slouží jako identifikační značka) a sondy polyklonálních protilátek a magnetických mikročastic (částice polyaminu o průměru 1 μm s magnetickým jádrem oxidu železa), které jsou funkcionalizovány monoklonálními protilátkami. Polyklonální a monoklonální protilátky rozeznávají a váží se ke stejnému cílovému proteinu, přičemž stlačí protein jako sendvič mezi nanočásticí a mikročásticí – **obr. č. 61**. Poté, co je „sendvič“ magneticky odstraněn z roztoku, jsou uvolněny řetězce DNA s čarovým kódem a mohou být s použitím standardní metody detekce DNA přečteny. Zvýšená citlivost testu se odvozuje především od velice účinného oddělení proteinu/antigenu a od amplifikačního procesu, ke kterému dochází v důsledku velkého množství vláken DNA s čarovým kódem (u nanočástic o velikosti 13 nm může každá nanočástice podporovat až 100 vláken DNA), které jsou uvolněny pro každý případ, kdy dochází k rozpoznání a k vzniku vazby.

Technologie testů pomocí biologického čarového kódu byla vyzkoušena s cílem detekovat velmi nízké koncentrace volných antigenů specifických pro prostatu (PSA). Antigeny specifické pro prostatu jsou spojovány s rakovinou prostaty a prsou. U žen, které mají rakovinu prsu, se volný PSA nachází v séru v mnohem menší koncentraci než je tomu u mužů a je cílem zkoumání při vyšetření ohledně rakoviny prsu. Technologii testů pomocí biologického čarového kódu lze využít k indentifikaci různých markerů ještě předtím, než dojde k vývoji symptomů a onemocnění tak lze léčit v jeho zárodku, kdy je léčba nejefektivnější. Test může být potenciálně aplikován i při vyšetření krve, které se týká HIV, prionů (Creuzfeldt-Jakobova choroba), mnoha forem rakoviny a určitých srdečních a plicních markerů. Na technologii testů pomocí biologického čarového kódu má licenci společnost Nanosphere, Inc. (Northbrook, Illinois, USA). V současné době společnost Nanosphere vyvíjí platformu, určenou ke snadnému použití, která se nazývá Verigene™ systém, který automaticky analyzuje a vysoce citlivě detekuje proteiny a nukleové kyseliny a používá k tomu modulární mikrofluidní laboratoř na čipu<sup>259</sup>.



**Obr. č. 61** Stlačený cílový protein při zkoušce biologického čarového kódu.

(Nanočástice zlata povlakované DNA (oligonukleotidy) tvoří základ testu biologického čarového kódu, který využívá větších magnetických makročastic k detekci attomolárních koncentrací proteinů séra. V tomto případě je monoklonální protilátka k specifickému antigenu prostaty (PSA) připojena k magnetické makročastici, která zachycuje volný PSA. Druhá polyklonální protilátka vůči PSA, která je připojena k nanočástici, vytváří sendvič ze zachyceného proteinu a ze dvou částic, který lze snadno oddělit pomocí magnetického pole<sup>258 (Nam.)</sup>)

<sup>259</sup> Shaikh K.A. et al „A Modular Microfluidic Architecture for Integrated Biochemical Analysis“, PNAS, 102, 2005, str. 9743.

### 5.3. NANOMATERIÁLY

Nedávno byla zveřejněna cestovní mapa (roadmap) budoucího využití nanomateriálů v sektoru medicíny a zdraví<sup>260</sup>. Z cestovní mapy vyplývá, že nanomateriály se uplatňují nebo se očekává jejich uplatnění téměř ve všech oblastech medicíny, v kosmetice a potravinářství, ať již jde o nanočástice kovů, oxidů kovů nebo polymerů, uhlíkové a polymerní nanotrubic, různé nanokompozity, nanoporézní materiály, nanoemulze a polymerní struktury různého složení. Zpráva rovněž upozornila na nezbytnost zkoumání možné toxicity některých nanomateriálů (zejména nanočástic) a na problémy v komunikaci mezi experty na materiály a biology či lékaři

Tato podkapitola se zabývá novými nebo zlepšenými materiály, o kterých se předpokládá, že budou mít velký vliv na rozvoj nanobiotechnologií a nanomedicíny. Nanomateriály můžeme charakterizovat podle chemického složení, tvaru, rozměrů, funkčních vlastností ap. V následujícím textu budeme uvedené možnosti kombinovat. Charakterizovány jsou jen nedůležitější typy nanomateriálů. Jsou naznačeny i způsoby použití nanomateriálů v nanobiotechnologiích. S dalšími informacemi o použití různých materiálů jsme se již setkali nebo se dále setkáme v různých částech této publikace.

#### 5.3.1. NANOČÁSTICE PRO BIOMOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKU

Nanostrukturní materiály poskytují přitažlivou základnu pro detekci biomolekul, protože, ve srovnání s doposud používanými molekulárními fluorofory, vykazují zvýšenou citlivost a umožňují miniaturizaci. V uplynulých deseti letech bylo v této oblasti dosaženo významného pokroku<sup>261</sup>.

V současné době spočívají analýzy DNA převážně v kombinaci její amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a detekce molekulárními fluorofory. Byly zkonstruovány mikrosoubory sond obsahujících tisíce unikátních sekvencí. Zůstávají však některé nedostatky – např. široké emisní a absorpční pásy a postupné vyhasínání fluoroforů, což snižuje přesnost analýz. Pro hodnocení fluorescence jsou zapotřebí sofistikované algoritmy a nákladná zařízení, což omezuje použití v běžných laboratořích. Proteiny jsou všeobecně detekovány imunologickými testy (immunoassays). Hlavní metodou pro identifikaci proteinů zůstává, jak již bylo uvedeno, ELISA, která má detekční limit v pikomolech. Opět, použití molekulárních fluoroforů má své nevýhody.

Řada výzkumných prací ukázala, že zejména nanočástice mohou pro svoji vysokou reaktivitu a pro chemicky říditelné výhodné elektrické, elektrochemické, optické a magnetické vlastnosti významně přispět ke zlepšení metod molekulární diagnostiky a rozpoznávání.

##### 5.3.1.1. Nanočástice zlata

Nanočástice zlata se získávají redukcí jednoduchých solí zlata s přidáním speciálních pomocných látek. Množstvím redukční látky lze upravit jejich velikost na rozmezí od 3 do 120 nm. Účinné látky a cílové molekuly se mohou připojit k nanočásticím zlata prostřednictvím

---

<sup>260</sup> De Goot R., Loeffler J., Sutter U. „Roadmap Report Concerning the Use of Nanomaterials in the Medical & Health Sector“, zpráva projektu FP6 „NanoroadSME“, 3/2006, [www.nanoroad.net](http://www.nanoroad.net)

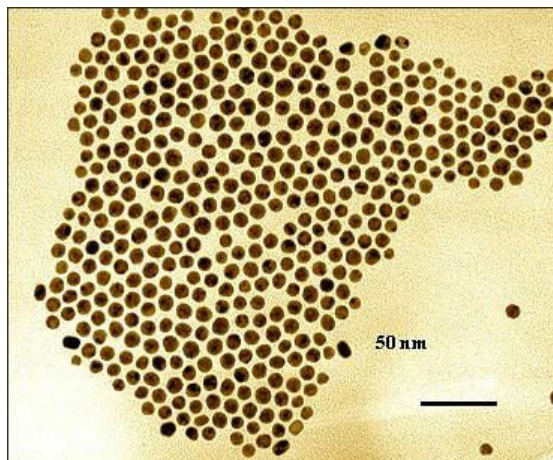
<sup>261</sup> Jain K.K. „Nanodiagnosics: Application of Nanotechnology in Molecular Diagnostics“, Expert Rev. Mol. Diagn., 3, 2003, str. 153.

Fortina P. et al „Nanobiotechnology: The Promise and Reality of New Approaches to Molecular Recognition“, Trends in Biotechnology, 4, 2005, str. 168.

Tansil N.C., Gao Z. „Nanoparticles in Biomolecular Detection“, Nanotoday, 1, 2006, No. 1, str. 28.

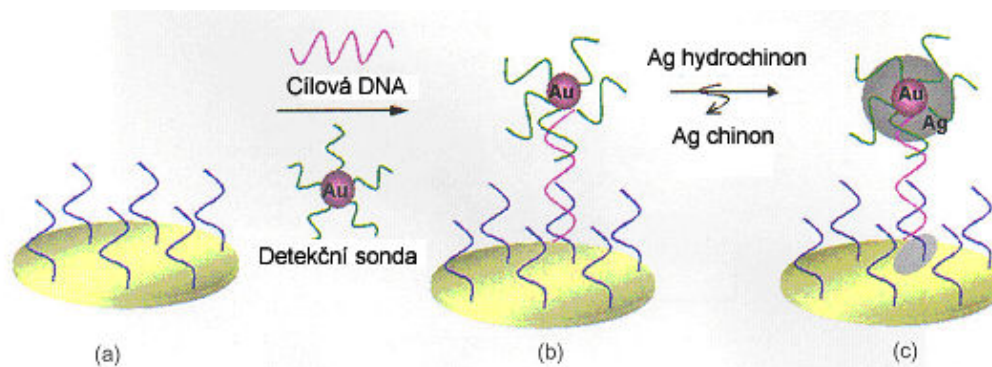
thiolové vazby<sup>262</sup> – schematicky je tato vazba znázorněna na **obr. č. 32**. Na snímku z elektronového mikroskopu - **obr. č. 62** - jsou zachyceny typické nanočástice zlata<sup>263</sup>. Nanočástice zlata jsou dostupné na trhu<sup>264</sup>.

**Obr. č. 62** Nanočástice zlata



#### 5.3.1.1.1. Využití při optické detekci

V roce 1996 objevili Chad A. Mirkin et al metodu samosestavování zlatých nanočástic do makroskopických agregátů, která umožnila připojení nekomplementárních DNA oligonukleotidů k jejich povrchu pomocí thiolové vazby<sup>79</sup>. Přitom byly pozorovány změny barvy způsobené jednak rozptylovými vlastnostmi agregátu 13 nm Au nanočástic s připojenými oligonukleotidy, jednak interakcí mezi povrchovými plasmony částic, jak se vzdálenost mezi nanočásticemi měnila. Tato optická, na vzdálenosti částic závislá vlastnost, byla později využita v mnoha biomolekulárních detekčních metodách, nejprve v kolorimetrii. Citlivost kolorimetrické detekce je možné zvýšit katalytickou depozicí Ag na Au nanočásticích<sup>265</sup>. Schéma takového postupu je na **obr. č. 63**



**Obr. č. 63** Schéma postupu přípravy DNA testu s využitím nanočástic zlata  
a) imobilizace sond zachycených na zlaté elektrodě b) hybridizace cílové DNA a označené detekční sondy c) amplifikace Ag

Au i Ag nanočástice mají velmi vysokou schopnost rozptylovat světlo. Tyto částice, někdy nazývané plasmově-rezonantní částice, jsou odolné proti vyhasínání a generují signály o velmi vysoké intenzitě (částice Au o rozměru 60 nm je ekvivalentní k  $3,3 \times 10^5$  molekulám

<sup>262</sup> Goodsell D.S.: „Bionanotechnology“, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2004, str. 24, ISBN 0-471-41719-X

<sup>263</sup> www.nanomat.com

<sup>264</sup> www.sigmaldrich.com

<sup>265</sup> Taton T.A. et al „Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes“, Science, 289, 2000, str. 1757.

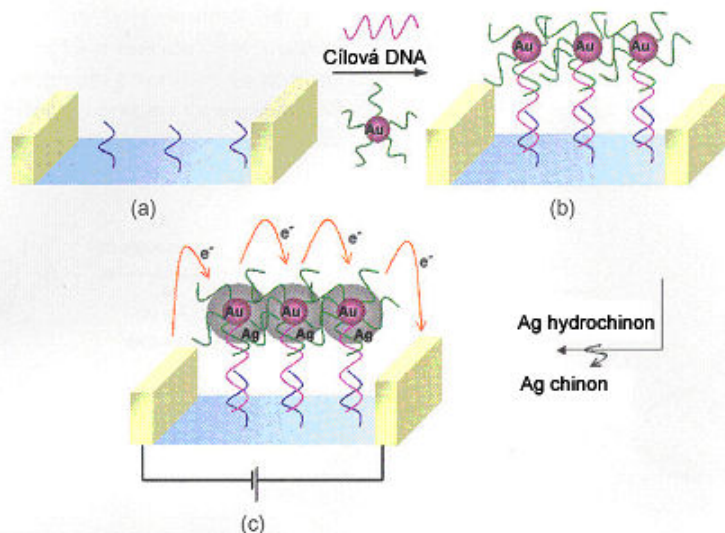


fluoresceinu). Připojení biomolekul, jako např. protilátek nebo DNA, k těmto nanočásticím nezpůsobuje žádnou změnu jejich optických vlastností. Au nanočástice se proto používají jako značky k označování jak nukleových kyselin, tak proteinů.

Optické vlastnosti nanočástic zlata byly rovněž využity při amplifikaci metody bio-bar code<sup>266</sup>, v kombinaci s Ramanovou spektroskopií (RS, SERS), jako podpěrná nanostruktura a současně nano-zhášec fluoroforů pro homogenní detekci nukleových kyselin<sup>267</sup> a v dalších případech.

### 5.3.1.1.2. Využití při elektrické detekci

Přímá elektrická detekce je jednou z nejjednodušších metod pro zkoumání bioafinity<sup>268</sup>. Elektrická detekce DNA hybridizace při použití Au nanočástic jako značek je schematicky znázorněna na **obr. č. 64**. Probíhá ve třech etapách. Nejprve jsou mezi dvěma elektrodami s mezerou v rozměru několika  $\mu\text{m}$  imobilizovány uchycené sondy uspořádané v mikrosouboru (a).



**Obr. č. 64** Elektrická detekce DNA hybridizace při použití Au nanočástic

Poté následuje hybridizace cílové DNA a sondou označenými Au nanočásticemi, které se lokalizují v mezeře elektrod a nakonec se provede redukční depozice Ag, které vytvoří můstek snižující odpor v mezeře. Detekce změn vodivosti vedly k detekčnímu limitu cca 500 fM. Tato jednoduchá metoda byla použita též při detekci SNP (single nucleotide polymorphisms) – nejhojnějších forem genetických změn v organismu<sup>269</sup>. Další zlepšení elektrické detekční metody bylo provedeno pro imunologické testy. Zmenšením mezery mezi elektrodami pod 100 nm byla zjištěna taková změna vodivosti, že nebyla třeba amplifikace Au nanočástic stříbrem<sup>270</sup>.

### 5.3.1.1.3. Využití při elektrochemické detekci

Senzory založené na elektrochemii poskytují při detekci DNA sekvencí nebo mutace genů spojených s lidskými nemocemi dobrou citlivost, selektivitu a nízkou cenu. DNA elektrochemické senzory využívají řady chemických přístupů, které jsou založeny na

<sup>266</sup> Nam J.M. et al „Bio-bar-code-based DNA Detection with PCR-like Sensitivity“, J. Am. Chem. Soc., 126, 2004, str. 5932.

<sup>267</sup> Maxwell D.J. et al „Self-assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules“, J. Am. Chem. Soc., 124, 2004, str. 9606.

<sup>268</sup> Park S.J. et al „Array-based Electrical Detection of DNA with Nanoparticle Probes“, Science, 295, 2002, str. 1503.

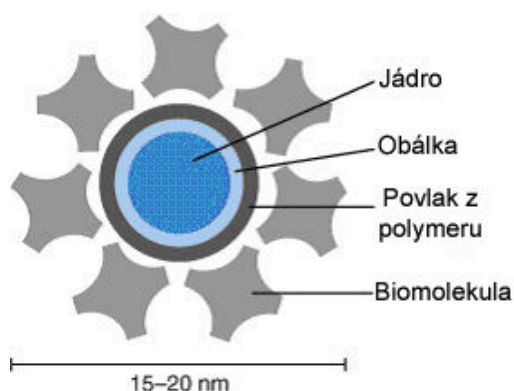
<sup>269</sup> Burmeister J. et al „Single Nucleotide Polymorphism Analysis by Chip-based Hybridization and Direct Current Electrical Detection of Gold-labelled DNA“, Anal. Bioanal. Chem., 379, 2004, str. 391.

<sup>270</sup> Haguët V. et al „Combined Nanogap Nanoparticles Nanosensor for Electrical Detection of Biomolecular Interaction between Polypeptides“, Appl. Phys. Lett., 84, 2004, str. 1213.

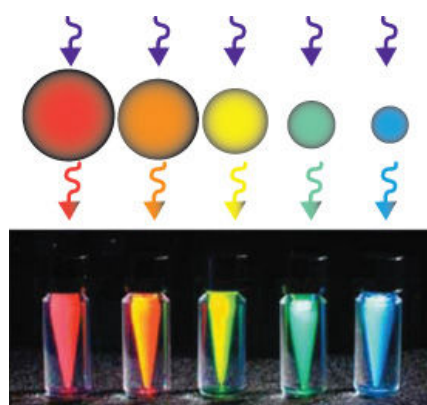
interakcích probíhajících v nanometrickém měřítku mezi targetem v roztoku, rozpoznávací vrstvou a pevným povrchem elektrody. Řada metod využívá elektrochemické amplifikace s nanočásticemi. V mnoha případech bylo využito pro elektrochemické značky při detekci nukleových kyselin redukčně-oxidačních vlastnosti Au nanočástic<sup>271</sup>.

### 5.3.1.2. Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou klastry atomů obsahující několik set až několik tisíc atomů polovodivého materiálu (CdSe, CdTe ap.). Klastry o rozměru 2 – 10 nm lze charakterizovat jako nanočástice o velikosti proteinů. Polovodičové jádro je povlečeno pro zlepšení optických vlastností tenkou vrstvou jiného polovodiče (ZnS) a posléze vrstvou polymeru pro lepší připojování biomolekul – obr. č. 65. V podstatě jsou kvantové tečky fluorofory, tj. látky, které absorbují světelné fotony, které pak reemitují na jiné vlnové délce. Jsou-li kvantové tečky ozářeny, pak menší binární kvantové tečky emitují na kratší vlnové délce jako je třeba modrá, zatímco větší tečky emitují na delší vlnové délce jako je například červená – obr. č. 66.



**Obr. č. 65** Schéma struktury konjugované kvantové tečky (Rozměry jednotlivých částí kvantové tečky odpovídají přibližně skutečnosti)



**Obr. č. 66** Pět roztoků s nanokrystaly různé velikosti jsou excitovány UV světlem stejné vlnové délky. Rozměry nanočástic určují barvu roztoku.

Využití kvantových teček v biologii je jednou z nejrychleji se rozvíjejících oblastí nanobiotechnologie. Unikátní optické vlastnosti kvantových teček je předurčují k použití jako *in vivo* a *in vitro* fluorofory v mnoha biologických výzkumech v případech, kdy tradiční fluorescenční značky založené na organických molekulách nemají potřebnou dlouhodobou stabilitu a v případech, kdy je zapotřebí současná detekce sdružených signálů. Kvantové tečky mohou být rozpustné ve vodě a mohou být připojeny ke specifickým molekulám, což vedlo k slibným aplikacím při označování buněk, zobrazování tkání v hloubce těla, označování v mikrosouborech a jako účinné donory při fluorescenčním rezonančním přesunu energie (FRET)<sup>272</sup>.

Kvantové tečky mohou s biologickými materiály vytvářet biokonjugáty. Je to generický název pro označení kvantových teček spojených s proteiny, malými molekulami, oligonukleotidy ap., které se používají pro přímou vazbu k definovaným vazebním místům (targetům).

<sup>271</sup> Drummond T.G. et al „Electrochemical DNA Sensors“, Nature Biotechnology, 21, 2003, str. 1192.

<sup>272</sup> Medintz I.L. et al „Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing“, Nature Materials, 4, 2005, str. 435.

Na trhu je nyní k dispozici množství druhů kvantových teček vyráběných např. společností Invitrogen - Quantum Dot Corp. (Hayward, Kalifornie, USA)<sup>273</sup> nebo společností Evident Technology (Troy, New York, USA)<sup>274</sup>. Společnost Evident Technology nedávno oznámila, že uvádí na trh první komerčně dostupné polovodičové kvantové tečky pro výzkum ve vědách o živé přírodě. Tyto nové kvantové tečky, nazvané T2-MP EviTags<sup>TM</sup> jsou charakteristické ternárním složením, sestávajícím z nanočástic InGaP povlakovaných ZnS a přírodním biopovlakem na vnější vrstvě. T2-MP EviTags<sup>TM</sup> mají potenciálně řadu výhod před standardními kvantovými tečkami, zejména pokud jde o nízkou toxicitu a široké spektrum barev (až po blízké infračervené pásmo).

#### 5.3.1.2.1. Využití při biozobrazování

Integrace biomateriálů (proteinů, peptidů nebo DNA) s polovodičovými kvantovými tečkami a kovovými nanočásticemi značně zvětšila úlohu biofotoniky a bioelektroniky, zejména v optickém zobrazování, biodetekci a terapeutických postupech<sup>275</sup>. První aplikaci kvantových teček (CdSe/ZnS) jako fluorescenčních značek při biozobrazování oznámili v roce 1998 P. Alivisatos s jeho skupinou v dodnes velmi citovaném článku<sup>276</sup>. Svoji metodu představili při zviditelnění tumoru pojivové tkáně u myši. Téměř ve stejnou dobu připravili W. Chen a S. Nie ve vodě rozpustné CdSe kvantové tečky povlečené ZnS. Kvantové tečky označené proteinem transferrinem prošly receptorem zprostředkovanou endocytózou v určitých buňkách a kvantové tečky označené imunomolekulami rozpoznaly specifické protilátky<sup>277</sup>. Uvedené práce daly základ pro použití kvantových teček jako bioznaček a otevřely cestu pro použití polovodičových nanočástic v biologických aplikacích.

Významný pokrok byl dosažen při použití polovodičových nanokrystalů v zobrazování rakoviny<sup>278</sup>. Kvantové tečky (CdSe) byly spojeny s imunoglobulinem G (IgG) a streptavidinem pro označení markeru rakoviny prsu (Her2), pro zbarvení vláken aktinu a mikrotubulí v cytoplazmě a pro detekování jaderných antigenů uvnitř buňky. Všechny signály od značek byly pro jednotlivé targety specifické a jasnější a mnohem fotostabilnější než srovnatelná organická barviva. Práce v této oblasti se neustále rozvíjejí.

S rostoucí poptávkou po zobrazování struktur hluboko uvnitř těla se výzkumné práce zaměřily na kvantové tečky, které emitují světlo v oblasti vlnových délek 650-1000 nm (oblast blízká infračervené), tedy do oblasti, ve které je průnik světla tkáněmi a krví maximální. Byly úspěšně syntetizovány kvantové tečky s říditelnou fotoemisí jako HgTe, CdHgTe, PbSe, InP a InAs<sup>222</sup>. Poměrně nedávno učinili Kim et al významný pokrok v zobrazování rakoviny, když použili kvantové tečky CdTe – CdSe (jádro – obálka)<sup>279</sup>. Tyto nanočástice mají cikcakovou pásovou strukturu a označují se jako kvantové tečky II. typu. Excitované díry a elektrony se zdržují v CdTe jádru, resp. v CdSe obálce a kvantové tečky emitují světlo blízko infračervené části spektra. Kvantové tečky povlečené oligomerním fosfinem měly průměr 15,8 nm, což byl ideální rozměr pro zadržení teček v rakovinou napadené lymfatické uzlině. Tečky byly použity pro zmapování nemocné lymfatické uzliny, což je hlavní postup

<sup>273</sup> www.invitrogen.com

<sup>274</sup> www.evidenttech.com

<sup>275</sup> Wang Y. et al „Bioapplication of Nanosemiconductors“, *Nanotoday*, 5/2005, str. 20.

<sup>276</sup> Bruchez Jr. M., Moronne M., Gin P., Weiss A., Alivisatos A.P. „Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels“, *Science*, 281, 1998, str. 2013.

<sup>277</sup> Chen W.C.W., Nie S. „Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection“, *Science*, 281, 1998, str. 2016.

<sup>278</sup> Wu X. et al „Immunofluorescent Labeling of Cancer Marker Her2 and Other Cellular Targets with Semiconductor Quantum Dots“, *Nature Biotechnology*, 21, 2002, str.41.

<sup>279</sup> Kim S. et al „Near-infrared Fluorescent Type II Quantum Dots for Sentinel Lymph Node Mapping“, *Nature Biotechnology*, 22, 2003, str. 93.

v rakovinné chirurgii. Po injekci teček do velkého živočicha (pouze 400 pmol do 35 kg hmotného prasete) byl chirurg schopen sledovat lymfatický tok bezprostředně k uzlině v reálném čase a identifikovat během několika minut polohu nemocné uzliny asi 10 mm pod kůží. Vzhledem k větší fotostabilitě, ve srovnání s konvenčními barvivy, může chirurg kontrolovat místo po zákroku a zjistit jeho účinnost.

#### 5.3.1.2.2. Využití při optické detekci

Biokonjugované kvantové tečky jsou pro optickou detekci velmi atraktivní, protože jsou dlouhodobě fotostabilní, což dovoluje jejich plynulý monitoring v reálném čase. Emise biokonjugovaných kvantových teček je úzká a symetrická, a proto je přesah barev minimální. Může se použít mnoho barev simultánně. Biologické konjugáty s kvantovými tečkami se používají jako jednoduchá náhrada analogických klasických konjugátů s barvivem v případě, že je požadována lepší výkonnost s cílem dosáhnout nižších limitů detekce, více kvantitativních výsledků, větší světelné stálosti vzorků nebo vyšší úrovně multiplexování. V kombinaci tyto spektrální vlastnosti, které jsou nesrovnatelné s jakýmkoli známým fluoroforem organických barviv, umožňují systematickou výrobu mikrosouborů a biosenzorů, které mají různá biochemická specifika, mohou být excitovány a simultánně detekovány.

V odborné literatuře se nacházejí stovky příkladů použití kvantových teček jako fluoroforních značek v DNA mikrosouborech. Např. byla pomocí kvantových teček realizována unikátní detekce abnormalit chromozomu nebo mutací s využitím *in situ* hybridizace<sup>280</sup>, v imunologických testech byl úspěšně detekován indikátor rakoviny marker Her2<sup>226</sup>, toxiny záškrtu a tetanu detekované současně<sup>281</sup> atd. Jako chemické senzory mohou fungovat hybridní konjugáty anorganická látka – bioreceptor sestavené z kvantových teček a proteinů. V těchto systémech se na každé kvantové tečce samosestavují mnohonásobné kopie barvou označených proteinů, což umožňuje fluorescenční rezonanční přesun energie (FRET) mezi kvantovou tečkou a molekulami barvy a z toho plynoucí zesílený signál<sup>282</sup>. Detekční limity analytických postupů využívajících FRET mohou být až 10 ppt s lineárním dynamickým rozsahem od 0.1 ppt do 1000 ppt. V případě senzorů může být účinnost FRET dále zvýšena použitím luminiscentních nanodrátků nebo nanostruktur s velkým poměrem povrch/objem.

R.Robelek et al prokázali vhodnost konjugátů kvantová tečka – DNA pro fluorescenční spektroskopii zesílenou povrchovými plasmony. Navíc, systém kvantová tečka – DNA byl přemístěn i do povrchovými plasmony zesílené fluorescenční mikroskopie. Využití této techniky, v kombinaci s mikrosouborem, ve kterém byly sondy uspořádány jako individuální povrchové body, mělo za následek simultánní kvalitativní analýzu systému konjugát kvantových teček – DNA řetězce s mnohobarevným zobrazením<sup>283</sup>.

---

<sup>280</sup> Pathak S. et al „Hydroxylated Quantum Dots as Luminescent Probes for *In-situ* Hybridization“, J. Am. Chem. Soc., 123, 2001, str. 4103.

<sup>281</sup> Hoshino A. et al „Simultaneous Multicolor Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy“, Microbiology and Immunology, 49, 2005, str. 461.

<sup>282</sup> Medintz I.L. et al „Reversible Modulation of Quantum Dot Photoluminescence Using a Protein- Bound Photochromic Fluorescence Resonance Energy Transfer Acceptor“, J. Am. Chem. Soc., 126, 2004, str. 30. Clapp A.R. et al „Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors“, J. Am. Chem. Soc., 126, 2004, str. 301.

<sup>283</sup> Robelek R. et al „Multiplexed Hybridization Detection of Quantum Dot-conjugated DNA Sequences Using Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Microscopy and Spectrometry“, Analytical Chemistry, 76, 2004, str. 6160.

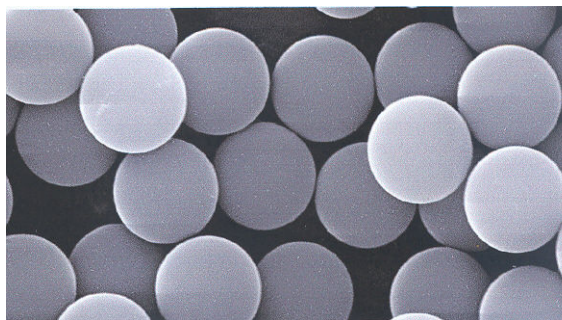
### 5.3.1.2.3. Využití při elektrochemické detekci

Použití kvantových teček pro elektrochemické monitorování hybridizace DNA bylo poprvé popsáno J.Wangem et al<sup>284</sup>. Metoda je založena na elektrochemické rozpouštěcí analýze a využívá dobrých rozpouštěcích vlastností Cd a Pb iontů. Rozpouštěcí analýza sestává ze dvou etap – akumulace látky, která má být analyzována (v daném případě Cd z rozpouštěných CdS kvantových teček připojených na DNA) a voltametrického měření rozpuštěných kovových iontů na elektrodě. Nanočásticemi podporovaná precipitace Cd zintenzivňuje nanočásticové CdS značky a zesiluje rozpouštěcí signál, což vede k detekčnímu limitu 100 fM pro cílovou DNA o 32 bazích. Ve stejné metodě byly vyzkoušeny i kvantové tečky PbS a ZnS.

Kvantové tečky jako značky byly použity i při elektrochemické impedanční spektroskopické detekci (EIS). Metoda je založena na konjugátech DNA – kvantové tečky ve spojení s EIS.. Jednovláknové DNA sondy byly kovalentně imobilizovány na zlaté elektrodě modifikované monovrstvou merkaproacetické kyseliny. Po hybridizaci s cílovým ssDNA-CdS konjugátem byla pro detekci změny odporu při transferu elektronů mezi elektrodou a redox markerem v roztoku použita EIS. Odpor vzrůstá v průběhu hybridizace konjugátu s oligonukleotidovou sondou, což má za následek stonásobné zesílení, je-li cílová DNA označena nanočásticemi CdS.

### 5.3.1.3. **Nanočástice SiO<sub>2</sub>**

Oxid křemičitý – SiO<sub>2</sub> – se nachází v přírodě v 17 krystalických formách, např. jako křemen nebo chalcedon. Vyskytuje se i v živé přírodě (jako biogenický SiO<sub>2</sub>, např. opál) v různých mikroorganismech nebo živočiších, např. v různých mořských houbách. Je rozsáhle používán v průmyslu a různých výrobcích (sklo, portlandský cement, žáruvzdorný materiál, porcelán, elektronické součástky atd.). Ve formě nanočástic se používá v kosmetických přípravcích a zubních pastách. Nanočástice SiO<sub>2</sub> různých průměrů dodává řada firem, buď v suchém stavu nebo ve vodním roztoku (např. firma Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA<sup>285</sup>). Rozměry dodávaných částic mají obvykle velmi malý rozptyl – **obr. č. 67**. Kulovité nano- a mikročástice SiO<sub>2</sub> je možné funkcionalizovat řadou biomolekul. Mají velkou povrchovou plochu a ve srovnání s plochým povrchem mají zlepšenou kinetiku chemické vazby. Částice jsou hydrofilní a snadno se s nimi manipuluje. K negativně nabitým nukleovým kyselinám se SiO<sub>2</sub> váže za přítomnosti dvojvalentních kationtů, např. Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>. SiO<sub>2</sub> je dielektrikum.



**Obr. č. 67** Nanočástice SiO<sub>2</sub> (*d* = cca 100 nm).

<sup>284</sup> Wang J. et al „Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization Based on Cadmium Sulfide Nanoparticle Tags“, *Electrochemistry Communications*, 4, 2002, str. 722.

<sup>285</sup> [www.polysciences.com](http://www.polysciences.com)

#### 5.2.1.3.1. Využití při optické detekci

Výzkum využití barvou dopovaných nanočástic  $\text{SiO}_2$  jako značek DNA při její detekci se rozvinul po zveřejnění práce W. Tana et al.<sup>286</sup> Nanočástice byly syntetizovány reverzní mikroemulzí a sestávaly z mnoha molekul organického barviva v matrici  $\text{SiO}_2$ . Nanočástice byly velmi fluorescentní, extrémně fotostabilní a vhodné pro biokonjugaci při bioanalýze. Měly dobrý odpor proti fotovymáčení a dobrý amplifikační účinek. Na rozdíl od organických fluoroforů neblakaly. Bylo dosaženo zajímavého limitu detekce 0,8 fM.

Jiným příkladem je použití kompozitních  $\text{SiO}_2$  nanočástic s obálkou (core-shell)<sup>287</sup>. Nanočástice sestávaly z 15 nm Au jádra s chemisorpčně připojeným fluoroforem a 10-15 nm tlustou obálkou  $\text{SiO}_2$  s funkcionalizovanou thiolovou skupinou. Pro detekci v mikrosouboru byly částice konjugovány s DNA sondami. Použila se dvojbarevná detekce na DNA mikrosouboru. Bylo dosaženo detekčního limitu 1 pM. I když je tato metoda lepší než systémy využívající pouze molekulární fluorofory, není tak citlivá jako optická detekce s Au nanočásticemi.

#### 5.3.1.3.2. Další příklady použití nanočástic $\text{SiO}_2$

Uvádíme několik příkladů použití nanočástic  $\text{SiO}_2$  v nanobiotechnologiích a nanomedicině.

- Byly připraveny injektovatelné a rozprašovatelné částice porézního hydratizovaného  $\text{SiO}_2$  o rozměrech pod 100 nm, které opouštěly různé látky s velkou molekulovou hmotností (např. peroxidázu křenu nebo FITC – dextran). Částice vykazovaly téměř nulovou vyluhovatelnost po 45 dní<sup>288</sup>. Potenciální využití je v dopravě léků do organismu.
- Byly syntetizovány nanočástice  $\text{SiO}_2$  (10 – 100 nm) s kovalentně modifikovaným kationickým povrchem a zjištěna jejich schopnost elektrostaticky vázat a chránit plasmidovou DNA. Potenciální využití – doprava DNA v organismu<sup>289</sup>.
- Čínští vědci vyvinuli novou metodu pro chránění DNA, když použili biokonjugované, aminy modifikované nanočástice  $\text{SiO}_2$ . Pozitivně nabitě částice byly připraveny použitím mikroemulze „voda v oleji“. Plasmidové DNA se snadno na povrchu částic obohacovaly a řetězce DNA byly dobře chráněné před enzymatickým rozštěpováním. Metoda je jednoduchá a jeví se jako vhodná pro separaci DNA, manipulaci a detekci<sup>290</sup>.
- Malé zlaté nanočástice byly připojeny k větším  $\text{SiO}_2$  nanočásticím funkcionalizací povrchu  $\text{SiO}_2$  hydrofobickými skupinami jako  $\text{CH}_3$  nebo  $\text{PPh}_2$ <sup>291</sup>.
- Sférické dielektrické nanočástice  $\text{SiO}_2$  povlečené tenkou vrstvou zlata (tzv. kovová nanopouzdra) intenzivně pohlcují světlo vlnových délek blízkých infračervené části světelného spektra (700 – 1000 nm). Při těchto vlnových délkách je lidská tkáň pro

<sup>286</sup> Zhao X., Tapecc-Dytioco R., Tan W. „Ultrasensitive DNA Detection Using Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles“, J. Am. Chem. Soc., 125, 2003, str. 11474.

<sup>287</sup> Zhou X, Zhou J. „Improving the Signal Sensitivity and Photostability of DNA Hybridizations on Microarrays by Using Dye-doped Core-shell Silica Nanoparticles“, Analytical Chemistry, 76, 2004, str. 5302.

<sup>288</sup> Jain T.K. et al „Nanometer Silica Particles Encapsulating Active Compounds: A Novel Ceramic Drug Carrier“, J. Am. Chem. Soc., 120, 1998, str. 11092.

<sup>289</sup> Kneuer C. et al „Silica Nanoparticles Modified with Aminosilanes as Carriers for Plasmid DNA“, Int. Journal of Pharmaceutics, 196, 2000, str. 257.

<sup>290</sup> He X.-X- et al „Bioconjugated Nanoparticles for DNA Protection from Cleavage“, J. Am. Chem. Soc., 125, 2003, str. 7168.

<sup>291</sup> Westcott S.L. et al „Formation and Adsorption of Clusters of Gold Nanoparticles onto Silica Nanoparticle Surface“, Langmuir, 14, 1998, str. 5396.

světlo prostupná pro nedostatek chromoforů absorbujících světlo těchto délek. Této vlastnosti se využívá u řady diagnostických postupů (optická koherentní tomografie, laserové dopplerovské zobrazování, difúzní tomografie atd.). Američtí autoři zkombinovali oba jinak bezpečné způsoby (nanopouzdra a světlo) a vypracovali metodu, která dovoluje selektivní neinvazivní dodávku tepla pro ohřev tkáně (do hloubky) nádoru označeného nanopouzdry<sup>292</sup>. Způsob přípravy nanopouzdru autoři popsali již v roce 1998<sup>293</sup>. Nanopouzdra byla navíc povlečena tenkou vrstvou PEG<sup>294</sup> pro oklamání imunitního systému, zlepšení biokompatibility a prodloužení doby cirkulace nanopouzdru v krvi.

- K detekci jedné buňky bakterie byly použity nanočástice oxidu křemičitého dopované barvivem, které představují testovací nástroj pro kvantifikaci patogenů *in situ* ve vzorcích vody<sup>295</sup>. Tato metoda vysoce citlivé detekce využívá nanočástice oxidu křemičitého biokonjugované fluorescenčním barvivem (~ 60 nm v průměru). Uvnitř každé nanočástice jsou zachyceny tisíce fluoreskujících molekul barviva. Matrice oxidu křemičitého poskytuje nejen vysokou fotostabilitu molekul barviva uvnitř nanočástice, ale rovněž umožňuje snadnou úpravu povrchu pomocí konjugace různých biomolekul k nanočásticím. Monoklonální protilátky působící proti bakteriálním antigenům jsou znehybněny na nanočásticích pomocí kovalentní vazby, a tyto nanočástice jsou pak použity v imunologickém testu. Silného zintenzívnění fluorescenčního signálu je dosaženo tehdy, když se nanočástice biokonjugované protilátkou navážou na antigeny na povrchu bakterie, a tím umožní bakterii za pomoci spektrofluorometru detekovat. Test jediné bakterie je možné přizpůsobit i pro zjišťování mnoha vzorků (> 300 vzorků současně) a je rychlý, zabírá méně než 20 minut celkové přípravy vzorku, přípravy nástrojů a určení vzorku. Biologický test lze kromě toho použít i pro kvantifikaci mnoha patogenů *in situ* s vysokou přesností.

#### 5.3.1.4. Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice jsou středem velkého zájmu pro své potenciální možnosti použití v paměťových médiích o vysoké hustotě, ve spintronice a v diagnostické medicíně. Četné příklady využití magnetických nanočástic nalézáme i v přírodě (část 4.3.4.2. a přehled M.T. Klema et al<sup>296</sup>). Používají se zejména nanočástice oxidů železa ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, magnetit, maghemit) povlečené dextransy, siloxany a dalšími látkami.

##### 5.3.1.4.1. Použití při zobrazování magnetickou rezonancí

S ohledem na rozměrově závislé vlastnosti a rozměrovou podobnost s biomolekulami jsou magnetické nanočástice a jejich biokonjugáty použitelné jako kontrastní látky při *in vivo* zobrazování s použitím magnetické rezonance (MRI) – viz část 5.1.4.3. Jejich využívání je v současné době na počátku<sup>297</sup>. První použití oxidů železa (zejména magnetitu) v polovině

<sup>292</sup> Hirsch L.R. et al „Nanoshell-mediated Near-infrared Thermal Therapy of Tumors under Magnetic Resonance Guidance“, PNAS, 100, 2003, str.13549.

Loo Ch. et al „Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy“, Nano Lett., 5, 2005, str. 709.

<sup>293</sup> Oldenburg S.J. et al „Nanoengineering of Optical Resonances“, Che. Phys. Lett., 288, 1998, str 243.

<sup>294</sup> PEG – poly(etylen glykol) – viz 5.3.9.

<sup>295</sup> Zhao X. et al „A Rapid Bioassay for Single Bacterial Cell Quantitation Using Bioconjugated Nanoparticles“, PNAS, 101, 2004, str.15027.

<sup>296</sup> Klem M.T. et al „Biomimetic Magnetic Nanoparticles“, NanoToday, September 2005, str. 28.

<sup>297</sup> Neuberger T. et al „Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and Limitations of New Drug Delivery System“, J. Magnetism and Magnetic Materials, 293, 2005, str. 483.

osmdesátých let minulého století jako kontrastní látky při MRI ukázalo, že oxidy jsou superparamagnetické (magnetické domény se po zmagnetování uspořádají ve směru magnetického pole). Částice nemají zbytkový magnetismus.

Používané superparamagnetické oxidy železa se liší co do velikosti jádra, tloušťky povlaku a materiálu povlaku, což má velký vliv zejména při použití nanočástic *in vivo*. Velmi velké částice (300 nm – 3500 nm) povlečené nerozpustnou vrstvou se používají pro znázornění žaludku a střev, zatím co částice o velikosti 60 – 150 nm jsou po injekci rychle vstřebány v retikulo-endotheliálním systému a brzy se objeví v játrech a ve slezině. Velmi malé částice (10 – 40 nm) cirkulují v krevním řečišti mnohem déle než větší částice, mohou procházet přes stěny kapilár a často jsou nasáty lymfatickými uzlinami nebo kostní dřeví. Různé tělní systémy mohou být zobrazeny i bez použití různých specifických ligandů připojených na povrch nanočástic. V současné době již bylo povoleno používání nebo klinické zkoušky (americkou FDA) několik kontrastních látek s nanočásticemi<sup>298</sup>.

#### 5.2.1.4.2. Použití při magnetickém označování

Magnetické částice se začínají úspěšně používat i k označování a stopování buněk, v mikrosouborech a biosenzorech<sup>299</sup>. Superparamagnetické nanočástice jsou pro značkování velmi vhodné, protože jsou snadno magnetizovatelné na velké magnetické momenty, které umožňují detekci. Některé příklady:

Y.R. Chemla et al představili imunologický test, při kterém použili magnetické značkování superparamagnetickými nanočásticemi (35 nm povlečené nanočástice magnetitu) a pro identifikaci signálu SQUID „mikroskopu“<sup>300</sup>. Metoda byla demonstrována na modelovém systému liposomů obsahujících lidský receptor CCR5<sup>301</sup>.

SQUID mikroskop, s použitím 50 nm nanočástic magnetitu povlečených protilátkami, byl použit i pro detekování bakterií *Listeria monocytogenes*. Měřila se rychlost vazby mezi nanočásticemi a bakteriemi<sup>302</sup>.

Magnetické částice o průměru 250 nm byly použity při rychlé DNA-DNA hybridizaci na povrchu připojené DNA sondy s magneticky označeným targetem cDNA při použití pole střídavého proudu. Hybridizace byla urychlena<sup>303</sup>.

#### 5.3.1.5. Jiné nanočástice

Pro biomolekulární detekci byly vedle kovových a polovodičových nanočástic použity i další materiály.

Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub> je jednoduchý anorganický fosfor se spektrálně úzkou červenou emisí a dlouhou dobou fluorescence. H.Harma et al uchytili chelátované atomy Eu v polystyrenových nanočásticích se streptavidinem konjugovanými biomolekulami na povrchu a nanočástice (107, 210, 408 nm) použili jako značky pro mikrosoubory<sup>304</sup>. Cílovou látkou byl specifický

<sup>298</sup> LaConte L. et al „Magnetic Nanoparticle Probes“, NanoToday, May 2005, str. 32.

<sup>299</sup> Megens M., Prins M. „Magnetic Biochips: A New Option for Sensitive Diagnostics“, J. Magnetism and Magnetic Materials, 293, 2005, str. 702.

<sup>300</sup> SQUID – superconducting quantum interference device – detekuje magnetický tok ve vzorcích

<sup>301</sup> Chemla Y.R. et al „Ultrasensitive Magnetic Biosensor for Homogenous Immunoassay“, PNAS, 97, 2000, str. 14268.

<sup>302</sup> Grossman H.L. et al „Detection of Bacteria in Suspension by Using a Superconducting Quantum Interference Device“, PNAS, 101, 2004, str. 129.

<sup>303</sup> Ferreira H.A. et al „Rapid DNA Hybridization Based on ac Field Focusing of Magnetically Labeled Target DNA“, Appl. Phys. Lett., 87, 2005, str. 013901.

<sup>304</sup> Harma H. et al „Europium nanoparticles and Time-resolved Fluorescence for Ultrasensitive Detection of Prostate-specific Antigen“, Clinical Chemistry, 47, 2001, str. 561.



prostatický antigen (PSA) konjugovaný biotinem. Mikrosoubor byl analyzován fluorescenčním mikroskopem. Po tomto prvním pokusu následovala řada dalších prací jiných autorů s pokusy o detekci virů, hormonů, a DNA<sup>305</sup>.

Pro biomolekulární detekci byl vyvinut nový systém sestávající z nanočástic Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jako jádra dopovaného terbiem (poskytuje vysokou intenzitu fluorescence) a funkcionalizované obálky z polysiloxanu dopované fluoroforem. To umožnilo jednak disperzi částic ve vodním roztoku, konjugaci s biomolekulami a dvoubarevnou indikaci<sup>306</sup>.

Nedávno bylo sděleno, že nanostrukturní oxid zinečnatý (ZnO) může významně zvýšit účinnost biomolekulární fluorescence. ZnO nanočástice ve tvaru tyčinek byly úspěšně použity pro konstrukci velmi citlivého mikrosouboru pro detekci nukleových kyselin, proteinů a buněk<sup>307</sup>.

### 5.3.2. UHLÍKOVÉ NANOMATERIÁLY

Uhlík je univerzální prvek se schopností vázat se různými způsoby a vytvářet tak materiály s velmi různorodými vlastnostmi. Nejvíce se vyskytující forma čistého uhlíku na zemi je grafit, který se skládá z vrstev trigonálně vázaných atomů uhlíku uspořádaných do šesterečných pásů zvaných grafénové pásy – **obr. č. 68a**. Grafit je měkká, šedá pevná látka s vysokou elektrickou vodivostí ve směru grafénových pásů. Při extrémní teplotě nebo tlaku vytváří uhlík diamant, sestávající z uhlíkových atomů spojených do čtyřtění – **obr. č. 68b**. Diamant je vzácný kámen, který je průhledný, nevodivý a nejtvrdší známý materiál. Dále se uhlík vyskytuje v řadě uzavřených klecových struktur zvaných fullereny, z nichž nejslavnější je fulleren C<sub>60</sub> – **obr. č. 68c**. V roce 1991 byla v uhlíkovém nánosu vzniklém po obloukovém výboji objevena vysoce krystalická uhlíková vlákna, která měla průměr jen několik nanometrů a délku několik mikrometrů. Vlákna obsahovala atomy uhlíku uspořádaných do grafénových pásů svinutých do tvaru bezešvé válcové trubice. Každé vlákno obsahovalo několik koaxiálně uspořádaných trubic. Pro tuto strukturu se ujal termín uhlíkové nanotrubice – **obr. č. 68d**. Nanotrubice jsou buď jednotěnné (SWCNT) nebo víceštěnné (MWCNT). Fullereny a uhlíkové nanotrubice jsou typickými nanomateriály.

Z uhlíkových materiálů se zmíníme o fullerenech a uhlíkových nanotrubicích. Zájemce o další podrobnosti odkazujeme na publikaci Z. Weisse et al<sup>308</sup> a článek M. Enda et al<sup>309</sup>

#### 5.3.2.1. C<sub>60</sub> – fullereny

Objev, že existuje nová třetí allotropická forma uhlíku, jež obsahuje šedesát dokonale symetricky uspořádaných atomů uhlíku (C<sub>60</sub>), znamenal v roce 1985 opravdový průlom, který otevřel novou oblast uhlíkové chemie<sup>310</sup>. Geometrická konfigurace molekuly fullerenu sestává z 60 vrcholů s atomy uhlíku a 32 ploch, z nichž je 12 pětiúhelníkových a 20 šestiúhelníkových.

<sup>305</sup> Tansil N.C., Gao Z. „Nanoparticles in Biomolecular Detection“, Nanotoday, 1, 2006, No. 1, str. 36.

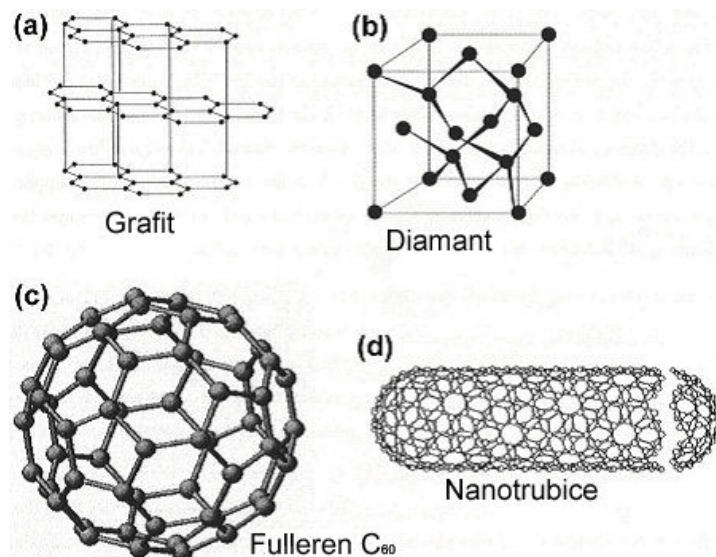
<sup>306</sup> Louis C. et al „Nanosized Hybrid Particles with Double Luminescence for Biological Labeling“, Chemistry of Materials, 17, 2005, str. 1673.

<sup>307</sup> Dorfman A et al „Highly Sensitive Biomolecular Fluorescence Detection Using Nanoscale ZnO Platforms“, Langmuir, 22, 2006, str. 4890.

<sup>308</sup> Weiss Z., Simha-Martínková G., Šustai O.: „Nanostruktura uhlíkatých materiálů“, Repronis Ostrava, 2005, ISBN 80-7329-083-9

<sup>309</sup> Endo M. et al „Applications of Carbon Nanotubes in the Twenty-first Century“, Proc. Trans. R. Soc.Lond. A, 362, 2004, str. 2233, celý text na [www.journals.royalsoc.ac.uk](http://www.journals.royalsoc.ac.uk)

<sup>310</sup> Kroto H.W. et al „C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene“, Nature, 318, 1985, str. 162



**Obr. č. 68** Čtyři formy uhlíku

Plochy jsou symetricky uspořádány a tvoří molekulární míč o průměru přibližně 1 nm - **obr. č. 68c**. Brzy po objevení C<sub>60</sub> bylo syntetizováno mnoho jiných fullerenových molekul různých tvarů a forem, jako například C<sub>70</sub>, C<sub>80</sub> atd.. Vyšší fulereny jsou rovněž zajímavé svými vlastnostmi a vzbuzují velké naděje.

#### 5.3.2.1.1. Syntéza fullerenu

Původně H.W. Kroto et al fullerene C<sub>60</sub> vyráběli metodou odpařování grafitu v heliu s použitím laseru. Tento proces nebyl kontrolovatelný a nebylo s ním možné vyrábět větší množství, které je potřeba ke komerčnímu využití. Proto mohlo být s materiálem provedeno jen málo pokusů a komplexní základní výzkum či dokonce odhad možných aplikací byl dost omezen. V roce 1990 se však molekuly C<sub>60</sub> a jiných fullerenu mohly již vyrábět ve větších množstvích, tj. v makroskopických gramových množstvích při použití zařízení s elektrickou uhlíkovou výbojkou<sup>311</sup>. Odpařováním grafitových elektrod v heliu za nízkého tlaku (0,1 atm) bylo získáno přibližně 100 mg čistého materiálu za den. Tím se otevřely zcela nové možnosti pro experimentální výzkum a průmyslové využití. V roce 1991 byla vynalezena nová metoda výroby fullerenu, která poskytla mj. základní vědomosti o jejich struktuře, což je nezbytné pro realizaci výrobního procesu ve větším měřítku<sup>312</sup>. Tato metoda syntézy spočívá v hoření uhlovodíkového paliva při podtlaku a umožnila i přípravu vyšších fullerenu. Rafinace produktů a zlepšování výrobního procesu stále pokračují. Nejsnázeji a nejlevněji se stále vyrábí C<sub>60</sub> (100\$/gram, čistota C > 99,9 %) a ceny postupně stoupají u vyšších fullerenu. V současné době je patentována řada způsobů výroby fullerenu a několik společností věří, že vyrobí v blízké budoucnosti desítky metrických tun za rok, což by pomohlo snížit cenu na 0,20 \$/gram.

#### 5.3.2.1.2. Vlastnosti a uplatnění

C<sub>60</sub> má zajímavé fyzikální, (bio)chemické, elektrické a optické vlastnosti. Tyto vlastnosti lze upravovat funkcionalizací molekuly, tj. připojením chemických skupin k atomům uhlíku. Např., když je krystalický C<sub>60</sub>, který je normálně nevodivý, dopován alkalickými kovy, jako

<sup>311</sup> Krätschmer W et al „Solid C<sub>60</sub>: A New Form of Carbon“, Nature, 347, 1990, str. 354.

<sup>312</sup> Howard J.B. et al „Fullerenes C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> in Flames“, Nature, 352, 1991, str. 139.

jsou například draslík, cesium nebo rubidium, může se z něj stát kov. Byly podány důkazy o tom, že  $C_{60}$  je supravodivý a v současnosti se zkoumá, zda lze  $C_{60}$  využít ve fotosyntetických aplikacích, tj. ve fotovoltaických zařízeních<sup>313</sup>.

Umístíme-li různé atomy kovů do dutiny uvnitř  $C_{60}$  nebo jiných fullerenu, mohou se významně změnit jejich vlastnosti. Takové fullereny jsou známy jako třída nanomateriálů nazvaná endohedrání kovové metalofullereny. Endohedrání metalofullereny jsou označovány symbolem  $X@C_y$ , kde X je atom prvku zachyceného v kleci a y je počet atomů uhlíku ve fullerenu. Reaktivní prvky mohou být uvnitř fullerenu klece stabilizovány. Zachycené prvky (ionty atd.) mohou měnit elektrické a magnetické vlastnosti molekuly fullerenu. Jelikož jsou endohedrání fullereny rezistentní vůči metabolickým procesům a jsou také vysoce kineticky stabilní, lze je využít jako nosiče pro biolékařské zobrazování *in vivo*<sup>314</sup>.

Od objevu fullerenu a jejich vlastností probíhá výzkum jejich uplatnění v nanobiotechnologiích a nanomedicíně. Přehled výsledků výzkumných aktivit využití derivátů fullerenu v biologických aplikacích, zahrnujících práce do roku 2003, zpracovali Susanna Bosi et al z Università degli Studi di Trieste. Z jejich přehledu vyplynulo, že fullereny mají velmi přitažlivé elektrochemické a fyzikální vlastnosti, které mohou být využity mnoha různých biologických oblastech. Např., fullereny mohou být použity jako radikální „zametači“: některé, ve vodě rozpustné deriváty, jsou schopny snížit koncentraci volných radikálů v buňkách. V jiných případech byla zjištěna výrazná antibakteriální aktivita fullerenu. Ke zvýšení hydrofilnosti fullerenu a rovněž i k přípravě nových sloučenin s biologickou a farmakologickou aktivitou, bylo využito různých způsobů funkcionalizace<sup>315</sup>. Deriváty  $C_{60}$  (zvané též fulleridy) mají vysokou fyzikální a chemickou afinitu k aktivní poloze různých enzymů jako je například proteáza HIV-1. Zavedením molekuly  $C_{60}$  do katalytické dutiny proteázy HIV-1 se způsobí, že tento základní enzym zabrání tomu, aby virus přežil<sup>316</sup>.

Fullereny a jejich deriváty jsou komerčně přístupné. Vyrábí je řada firem. Např., společnost SES Research z Houstonu, TX, dodává  $C_{60}$  ve třech jakostech za cenu 45 – 190 \$/gram a  $C_{70}$  ve třech jakostech za cenu 400 – 525 \$/gram<sup>317</sup>.

### 5.3.2.2. Uhlíkové nanotrubic

Uhlíkové nanotrubic patří mezi podivuhodné objekty, které někdy věda objeví a jež pravděpodobně provedou revoluci v technologickém vývoji 21. století. Jakožto čtvrtá allotropická forma uhlíku jsou uhlíkové nanotrubic rovněž molekuly, které sestávají pouze z atomů uhlíku. Lze je považovat za protažené fullereny. I když se od fullerenu očekávalo mnoho, na trhu se vyskytuje jen málo jejich praktických aplikací. U uhlíkových nanotubic jsou však prognózy velmi optimistické, jelikož jejich fyzikální vlastnosti, tzn. mechanické, elektronické, tepelné a optické, jsou o hodně lepší než u obvykle používaných materiálů.

V roce 1991 Sumio Iijima uveřejnil zprávu o existenci koncentrických mnohostěnných uhlíkových nanotubic (MWCNT), jakožto vedlejších produktů při vytváření fullerenu<sup>318</sup>. Skutečný vědecký průlom a objev nastal dva roky poté, kdy dva výzkumné týmy (Bethune et

<sup>313</sup> Cho Y.-J. et al „Unusually High Performance Photovoltaic Cell Based on a ( $C_{60}$ )fullerene Metal Cluster – porphyrin Dyad SAM on a ITO Electrode“, J. Am. Chem. Soc., 127, 2005, str. 2380.

<sup>314</sup> Cagle D.W. et al „*In vivo* Studies of Fullerene-based Materials Using Endohedral Metallofullerene Radiotracers“, PNAS, 96, 1999, str. 5182.

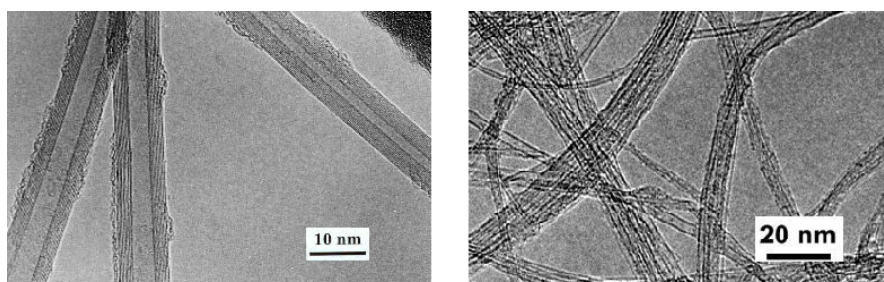
<sup>315</sup> Bosi S. et al „Fullerene Derivatives: An Attractive Tool for Biological Applications“, Eur. J. Med. Chem, 38, 2003, str. 913.

<sup>316</sup> Sijbesma R. et al „Synthesis of a Fullerene Derivative for the Inhibition of HIV Enzymes“, J. Am. Chem. Soc., 115, 1993, str. 6510.

<sup>317</sup> www.sesres.com

<sup>318</sup> Iijima S. „Helical Mikrotubules of Graphite Carbon“, Nature, 354, 1991, str. 56.

al, 1993 a Iijima a Ichihashi, 1993) nezávisle na sobě neočekávaně objevily jednotěnné uhlíkové nanotrubic (SWCNT), které sestávaly z jedné bezešvé válcové stěny atomů uhlíku. MWCNT můžeme považovat za soubor koncentrických SWCNT o různých průměrech, které se podobají válcům uvnitř válců. SWCNT představovaly skutečně nové nano objekty, které mají specifické vlastnosti a chování. Nedávno byly v čisté formě syntetizovány dvojstěnné uhlíkové nanotrubic (DWCNT)<sup>319</sup>. Tyto přechodné struktury budou mít pravděpodobně lepší materiálové vlastnosti a mohly by v budoucnu u některých aplikací nahradit MWCNT nebo SWCNT. Snímky SWCNT a MWCNT pořízené transmisí elektronovou mikroskopií jsou na **obr. č. 69**.



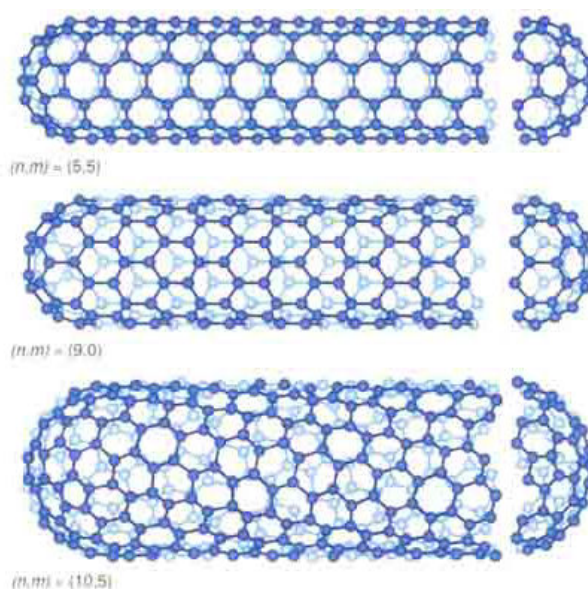
**Obr. č. 69** Jednotěnné (vlevo) a mnohostěnné uhlíkové nanotrubic

### 5.3.2.2.1. Struktura

Výsledná struktura jednotěnných uhlíkových nanotubic závisí na směru sbalení dvojrozměrné grafénové vrstvy. Byly identifikovány tři různé struktury (topologie) znázorněné na **obr. č. 70**: armchair, cik-cak a chirální (spirálová)<sup>320</sup>. Prvé dvě struktury mají vysoký stupeň symetrie. Termíny „armchair“ a „cik-cak“ se vztahují k uspořádání šestiúhelníků kolem obvodu. Třetí typ struktury je nejobyklejší. Výraz „chirální“ znamená, že struktura může existovat ve dvou zrcadlově odlišných typech. Způsob sbalení trubice má velký vliv na jejich vlastnosti. SWCNT mají střední průměr obvykle 1,2 – 1,4 nm.

Pokud se týká vícevrstevných nanotubic, jejich průměr dosahuje 1,2 – 20 nm. Mají 5 – 20 vrstev. Jednotlivé vrstvy se mohou lišit svojí topologií, takže reálná vícevrstvá nanotrubička má strukturu, která je „směsí“ všech tří ideálních struktur.

Délka uhlíkových nanotubic není dnes omezená, závisí na podmínkách syntézy a pohybuje se od desítek mikrometrů až po stovky mikrometrů nebo i více.



**Obr. č. 70** Struktury jednotěnných uhlíkových nanotubic a) struktura „armchair“, b) struktura cik-cak, c) struktura chirální

<sup>319</sup> Endo M. et al „Buckypaper from Coaxial Nanotubes“, Nature, 433, 2005, str. 476.

<sup>320</sup> Monthieux M. et al „Introduction to Carbon Nanotubes“, v „Springer Handbook of Nanotechnology“, vyd. B. Bhushan, Springer, 2003, str. 41.

### 5.3.2.2.2. Syntéza

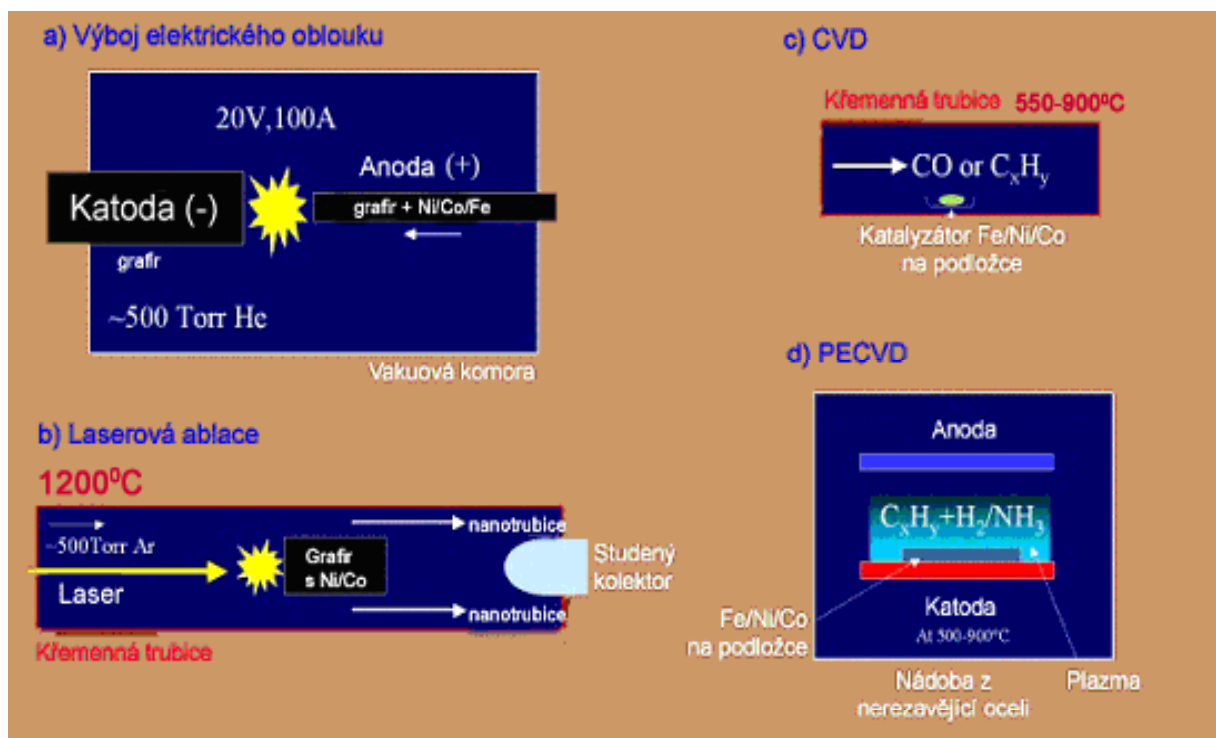
V současné době se pro výrobu uhlíkových nanotrubic používá tří hlavních technologií – **obr. č. 71**:

- výboj elektrického oblouku
- laserová ablace
- chemická depozice par (CVD)

První technologie spočívá ve vytvoření elektrického oblouku mezi dvěma grafitovými elektrodami, z nichž jedna je obvykle naplněna katalytickým kovovým práškem (např. nikl, železo, kobalt) v atmosféře helia – **obr. č. 71a**. Laserová ablace používá k odpaření grafitového terče laseru. Terč je rovněž obvykle naplněn katalyzátorem – **obr. č. 71b**. Obě uvedené technologie produkují směs uhlíkových materiálů obsahující nanotrubičky (70 %), amorfni uhlík a nanočástice katalyzátoru. Nanotrubičky musí být následně vhodným procesem čištění extrahovány.

Chemická depozice par používá při reakci s uhlovodíkovým plynem jako katalyzátor kovové nanočástice při teplotách 500 - 900 °C, **obr. č. 71c**. Variantou tohoto procesu je plasmou podporovaná CVD (PECVD), **obr. č. 71d**., při které mohou snadno růst vertikálně vyrovnané uhlíkové nanotrubičky.

Katalyzátor slouží jako templát, na kterém rostou nanotrubičky. Řízením rozměru katalyzátoru a reakční doby se může snadno upravovat jak průměr nanotrubic, tak i jejich délka.



**Obr. č. 71** Způsoby výroby uhlíkových nanotrubic

Poprvé byly SWCNT uvedeny na trh v roce 2002 společností Carbon Nanotechnologies, Inc. (Houston, Texas, USA) s velmi vysokými cenami - až 1000 \$/gram u syrového materiálu. Ceny stále klesají u společnosti Nanoledge S.A. (Montpellier, Francie), která nabízí SWCNT za cenu 65 €/gram, i když jsou syntetizovány metodou výboje elektrického oblouku (údaje z roku 2005). SWCNT syntetizované s použitím metody CVD jsou prozatím za o něco vyšší cenu 200 - 400 \$/gram a jsou prodávány například společností Nanostructured &

Amorphous Materials, Inc. (Los Alamos, New Mexico, USA). Asi čtyřicet globálních výrobců však nyní dosáhlo bodu, kdy kombinování poklesu cen s narůstající užitečností těchto výrobků umožní jejich široké využití. Očekává se, že v budoucnosti budou velmi nízké ceny až 0,03 \$/gram syrové vysoké koncentrace částic SWCNT.

#### 5.3.2.2.3. Dopované uhlíkové nanotrubice

Atomy uhlíku ve všech typech nanotubic lze nahradit jiným prvkem jako je například bór a/nebo dusík. O syntéze těchto uhlíkových nanotubic dopovaných B a/nebo N byla poprvé uveřejněna zpráva v roce 1994<sup>321</sup>. Kromě toho, že lze uhlík nahradit částečně, můžeme jej i zcela vyměnit. Překvapivým výsledkem takových pokusů je struktura podobná sendviči, která je vytvořena z mnohvrstevných koncentrických nanotubic, jejichž souosé trubice jsou utvářeny střídavě z uhlíkových grafénů a grafénů borodusíku<sup>322</sup>. Techniky syntézy se podobají metodám, používaným pro syntézu čistých uhlíkových nanotubic, tj. obloukový výboj, laserová ablace a CVD. Pro celkový přehled odkazujeme například na práci R. Ma et al<sup>323</sup>. Výhodou dopování je lepší kontrola nad elektronickými vlastnostmi nanotubic, a jelikož jsou koncentrace legovaných látek nízké (0,5%), nedochází ke zhoršování mechanických vlastností.

#### 5.3.2.2.4. Endohedrální uhlíkové nanotrubice

Vnitřní dutina SWCNT nebo MWCNT může být částečně nebo zcela vyplněna jinými atomy, molekulami, sloučeninami nebo krystaly. Podobně jako je tomu v případě fullerenu jsou takové hybridní nanotrubice označeny jako X@SWCNT nebo X@MWCNT, kde X je včleněný atom, molekula atd. Poprvé byly SWCNT v roce 1998 vyplněny C<sub>60</sub> při použití tepelného žíhání prášků C<sub>60</sub> nad SWCNT ve vakuu při teplotě > 600 °C<sup>324</sup>. Molekuly C<sub>60</sub> jsou uspořádány jako samosestavený řetězec uvnitř SWCNT, který se podobá nanoskopickému hrachovému lusku.

Endohedrální fullereny byly rovněž zavedeny do nitra SWCNT a byly syntetizovány složitější hybridní materiály na bázi nanotubic jako je například Gd@C<sub>82</sub>@SWCNT. Hybridní materiály na bázi nanotubic lze použít v elektronice a v mikro-elektromechanických systémech. Obecně vzato však fullereny, uhlíkové nanotrubice a "hrachové lusky" ještě čekají na širší uplatnění v biolékařství, částečně proto, že jsou extrémně hydrofobické, že se předpokládá jejich nízká biokompatibilita a že jsou vysoce chemicky stabilní (viz dále)..

#### 5.3.2.2.5. Funkcionalizované uhlíkové nanotrubice

Funkcionalizace uhlíkových nanotubic má významný dopad na jejich vlastnosti a uplatnění. I když se ukazuje, že kovalentní připojení molekul na boční stěny nanotubic je obtížné, funkcionalizace pomocí nekovalentní adsorpce molekul (biologických) je snadnější. Nevalentně zfunkčněné SWCNT si uchovávají hybridní vazby  $sp^2$  (nedochází k rozbití žádných vazeb), a proto i elektronickou strukturu uhlíkové nanotubice a poskytují místa pro selektivní vazby<sup>325</sup>. Pokud by byly jedinečné vlastnosti uhlíkových nanotubic použity ve

<sup>321</sup> Stephan O. et al „Doping Graphitic and Carbon Nanotube Structures with Boron and Nitrogen“, Science, 266, 1994, str. 1683.

<sup>322</sup> Suenaga K. et al „Synthesis of Nanoparticles and Nanotubes with Well-separated Layers of Boron Nitride and Carbon“, Science, 278, 1997, str. 653

<sup>323</sup> Ma R et al „Synthesis and Properties of B-C-N and BN Nanostructures“, Phil. Trans., Ser.A, Math.Phys.Eng.Sci., 362, 2004, str.2161

<sup>324</sup> Smith B.W. et al „Encapsulated C<sub>60</sub> in Carbon Nanotubes“, Nature, 396, 1998, str. 323.

<sup>325</sup> Chen R.J. et al „Noncovalent Sidewall Functionalization of Single Carbon Nanotube for Protein Immobilization“, J. Am. Chem. Soc., 123, 2001, str. 3838.

spojení se schopností biolomelulárního rozlišování (tj. protilátky), mohly by vést k výrobě miniaturních elektronických zařízení, do kterých můžeme zahrnout i sondy a senzory. V roce 2002 zpracovali Y.P Sun et al přehled vlastností a využití funkcionalizovaných uhlíkových nanotrubic v polymerních nanokompozitech, při zkoumání interakce nanotrubičky – molekula a při konjugaci nanotrubic s biologickými subjekty<sup>326</sup>.

#### 5.3.2.2.6. Vlastnosti a uplatnění

Uhlíkové nanotrubičky mají kombinaci velmi pozoruhodných vlastností:

- Velký poměr průměru (v nm) k délce (v mikrometrech)
- Vysokou mechanickou pevnost (mez pevnosti 30 - 60 GPa) a Youngův modul pružnosti (1 TPa)
- Vysokou elektrickou vodivost (typicky  $10^{-6}$  Ohm.m). U dobře krystalizovaných nanotrubic byl pozorován balistický transport.
- Vysokou tepelnou vodivost (1750-5800 W/mK)
- Jsou-li kovalentně vázány jako elektrické vodiče, netrpí elektromigrací nebo atomovou difúzí, a proto mohou přenášet proudy o vysoké hustotě ( $10^{13}$  A/m<sup>2</sup>)
- Jednotěnné nanotrubičky mohou být kovové nebo polovodiče
- Jsou chemicky inertní a nejsou napadány silnými kyselinami nebo zásadami
- V klastrech mají extrémně velkou povrchovou plochu
- MWCNT můžeme opakovaně ohýbat, aniž by u nich došlo ke katastrofálnímu defektu, což napovídá, že jsou pozoruhodně pružné a houževnaté
- Nízkou hustotu (1,3 – 1,4 g/cm<sup>3</sup> podle typu nanotrubičky)
- Významné elektrokatalytické vlastnosti

Uhlíkové nanotrubičky jsou potencionálním hlavním komponentem ve vysoce pevných materiálech, kde jsou využívány jako výtzuha kompozitních materiálů nebo kabelových součástí. Objevují se i jejich aplikace ve sportovním náčiní, jako jsou například tenisové rakety VS Nanotube Power a VS Nanotube Drivemade (cena cca 200 \$), které jsou vyrobeny z grafitu s modulu vysokým modulem pružnosti a uhlíkových nanotrubic. Vyrábí je společnost Babolat VS North America, Inc. (Boulder, Colorado, USA). Dalším produktem jsou hokejky Synergy SL a komponenty do jízdních kol (tj. řídítka), jejichž součástí je uhlíková nanotechnologie Zyvex's NanoSolve<sup>TM</sup> a které jsou vyrobeny společností Easton Sports, Inc. (Van Nuys, California, USA).

Výjimečné mechanické vlastnosti uhlíkových nanotrubic z nich činí ideální koncové hroty pro snímače síly (force sensors) v skenovací sondové mikroskopii, jakou je například mikroskopie atomových sil (AFM). Konec uhlíkové nanotrubičky může být rovněž specificky zfunkčnen nebo může být pokryt kovy, které zkvalitní zobrazovací techniky jak v mikroskopii chemických sil, tak i v mikroskopii magnetických sil. Koncové hroty pro AFM z MWCNT lze zakoupit u společnosti Seiko Instruments, Inc. (Chiba, Japonsko), Daiken Chemical Co., Ltd., (Osaka, Japonsko) a Piezomax, Inc. (Middleton, Wisconsin, USA).

Uhlíkové nanotrubičky (SWCNT) mají výjimečné elektrické a elektronické vlastnosti. Jsou kovové nebo polovodičivé v závislosti na jejich přesné struktuře, tj. na helicitě a průměru trubičky. Mohou se používat do plochých panelových obrazovek, do osvětlení například ve formě prvků do vakuových trubic, do žárovek v domácnosti, v plochých panelových luminiscenčních lampách, do plynových výbojek, do generátorů rentgenového záření, do

<sup>326</sup> Sun Y.-P. et al „Functionalized Carbon Nanotubes: Properties and Applications“, Acc. Chem. Res., 35, 2002, str. 1095.

elektronových trysek u skenovacích elektronových mikroskopů příští generace a do transmisních elektronových mikroskopů.

Polovodičové SWCNT jsou vysoce chemicky senzitivní a jsou schopny detekovat změny v chemickém složení okolní atmosféry při pokojové teplotě. Senzory pro chemické plyny na bázi uhlíkových nanotrubic mají velký komerční potenciál v mnohých oblastech počínaje lékařstvím, monitorováním životního prostředí, zemědělstvím až po chemický průmysl a podobně. V současné době vyvíjí společnost Nanomix Inc. lékařský senzor pro monitorování CO<sub>2</sub>.

#### 5.3.2.2.7. Potenciální využití v biotechnologiích a nanomedicině

Použití uhlíkových nanotrubic v bioaplikacích se zkoumalo již od doby jejich objevení. Jeden z ústředních cílů byl vývoj biosenzorů a bioreaktorů založených na uhlíkových nanotrubicích. Tento výzkum byl podporován experimentálními důkazy, že biologické objekty jako proteiny a enzymy mohou být imobilizovány buď v duté kavitě nebo na povrchu nanotrubic<sup>327</sup>. Nedávno byly posíleny naděje na použití uhlíkových nanotrubic jako vynikajících materiálů pro biosenzory (biočipy), když byla úspěšně vyrobena různá elektroanalytická zařízení s nanotrubicemi, přičemž tato zařízení byla modifikována biomolekulami. Tato prototypová zařízení, často připravená jako uspořádané soubory tranzistorů s jednou nanotrubicí, prokázala účinnou elektrickou komunikaci a slibnou citlivost, požadovanou v takových aplikacích jako jsou rozpoznání antigenů<sup>328</sup>, reakce katalyzované enzymy<sup>329</sup> a DNA hybridizace<sup>330</sup>.

Jiným příkladem biorozpoznávání je skenovací sondová mikroskopie (SPM), mapující biofunkční receptory a užívající sondu z uhlíkové nanotrubice, která byla funkcionalizovaná na hrotu biologicky specifickými ligandy<sup>331</sup>.

Existují předběžné výsledky, které svědčí o tom, že uhlíkové nanotrubice mohou sloužit jako elektromechanické aktuátory pro umělé svaly<sup>332</sup>.

Uhlíkové nanotrubice mohou, po funkcionalizaci vhodnými bioaktivními molekulami, sloužit jako substráty pro neuronální růst (neuritů, axonů)<sup>333</sup>.

Provádí se výzkum použití uhlíkových nanotrubic jako multifunkčních biologických transportérů, které mohou být použity při selektivní destrukci rakovinných buněk<sup>334</sup>.

Při vyhodnocování biokompatibility, s ohledem na biologické a biomedicínské aplikace, byl hlavní technický problém v nerozpustnosti uhlíkových nanotrubic ve vodním prostředí. Nedávný vývoj chemických modifikací a funkcionalizačních metod umožnil uhlíkové

<sup>327</sup> Davis J.J. et al „The Immobilisation of Proteins in Carbon Nanotubes“, *Inorganica Chimica Acta*, 272, 1998, str. 261.

<sup>328</sup> Chen R.J. et al „Noncovalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Highly Specific Electronic Biosensors“, *PNAS*, 100, 2003, str 4984.

<sup>329</sup> Gooding J.J. et al „Protein Chemistry Using Aligned Carbon Nanotube Array“, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 2003, str. 9006.

<sup>330</sup> Li J. et al „Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection“, *Nano Lett.*, 3, 2003, str. 597.

<sup>331</sup> Wong S.S et al „Covalently Functionalized Nanotubes as Nanometre-sized Probes in Chemistry and Biology“, *Nature*, 394, 1998, str. 52.

<sup>332</sup> Baughman R.H. et al „Carbon Nanotube Actuator“, *Science*, 284, 1999, str. 1340.

<sup>333</sup> Mattson M.P. et al „Molecular Functionalization of Carbon Nanotubes and Use as Substrates for Neuronal Growth“, *J. Molecular Neuroscience*, 14, 2000, str. 175.

Zhang X. et al „Guided Neurite Growth on Patterned Carbon Nanotubes“, *Tech. Proc. of the 2005 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, Vol. 1, Chapter 6: Bio Nano Materials, str. 304.

<sup>334</sup> Kam N.W.S. „Carbon Nanotubes as Multifunctional Biological Transporters and Near-infrared Agents for Selective Cancer Cell Destruction“, *PNAS*, 102, 2005, str. 11600.



nanotrubice rozpouštět a dispergovat ve vodě, což otevřelo cestu pro jejich manipulaci a úpravy ve fyziologickém prostředí. Detailní přehled o těchto pracích podali Y.Lin et al<sup>335</sup>.

Specifické je využití fluorescenčních vlastností uhlíkových nanotubic. Průkopnický objev z roku 2002 prokázal, že desítky různých typů polovodičových SWCNT vyzařovaly svůj vlastní jedinečný fluorescenční podpis<sup>336</sup>. Fluorescence se vyskytuje v případě, když substance (nebo molekulární sonda) absorbuje vysoce energetické fotony ze stanoveného světelného zdroje a v reakci na to vyzáří signál s odlišnou spektrální charakteristikou (nízkoenergetické fotony). Charakteristiku spektra lze rozlišit pomocí emisního filtru a zachytit vysoce citlivou kamerou. Laserové zdroje se obecně používají proto, že umožňují dodat energii do užších a lépe definovaných spektrálních oken. SWCNT absorbují a vyzařují světlo v blízkém infračerveném spektru (700 - 1000 nm), kde jsou lidská tkáň a biologické tekutiny částečně průhledné. V biologické tkáni, například v leukocytech, si SWCNT uchovávají své optické vlastnosti a vlastnosti buňky, jako je například tvar, míra růstu a schopnost buňky ulpívat na površích, nejsou ovlivněny<sup>337</sup>.

Předvídá se, že uhlíkové nanotrubice budeme moci potenciálně využít v lékařství při léčbě rakoviny a v biosenzorech na bázi fluorescence. Ačkoli je potřeba dokončit dlouhodobé výzkumy týkající se toxicity a biodistribuce ještě předtím, než budeme moci použít uhlíkové nanotrubice při lékařských testech, fluorescenční vlastnosti naznačují, že uhlíkové nanotrubice by mohly být využity jako zobrazovací markery při laboratorním výzkumu *in vitro*, a to zejména v případech, kdy vyvstává problém s vyhasínáním, toxicitou a znehodnocováním běžněji používaných markerů. Jelikož uhlíkové nanotrubice fluoreskují na jediné světelné vlnové délce, je mimo jiné možné přizpůsobit různé velikosti nanotubic a jejich elektrické vlastnosti na míru specifickým účelům, a tím i provést diagnózu četných nemocí v jediném testu.

Výzkum a počáteční aplikace uhlíkových nanotubic v biotechnologiích a nanomedicině prokrajují v současnosti velkým tempem. Každoročně je publikováno na tisíc výsledků výzkumných prací a zakládány jsou nové specializované firmy.

### 5.3.3. NANOČÁSTICE HYDROXYAPATITU (NanoHAP)

Hydroxyapatit je hexagonální forma fosforečnanu vápenatého -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  - přirozeně se vyskytující v kostech a zubech. Kost je přírodní materiál, jehož kombinace vlastností závisejí především na hybridní organicko – anorganické nanostruktuře. Struktura kosti obsahuje nanočástice bioapatitu (carbonate apatit), které jsou rozmístěny na rozhraní s kolagenem typu I. Svazky mineralizovaných kolagenových vláken jsou uspořádány do vstevnaté superstruktury, jejíž vlastnosti mají za následek význačnou kombinaci pevnosti a ohebnosti.

HAP se používá v implantátech kostí a zubů a v systémech pro dopravu léků. Je rovněž minerální složkou přírodních tvrdých tkání. Je-li přidán nebo povlečen na kterýkoliv materiál pro implantáty, vytváří biokompatibilní složku kompozitu a stimuluje růst kosti na rozhraní hydroxyapatitu a kosti. Úprava HAP na rozměry nanometrů (nanoHAP) otevřela cestu novým aplikacím, např. v oblasti implantátů. Velkost nanozrn nanoHAP je obvykle 20-120 nm. nanoHAP je dostupný za cenu 1600-2000 €/kg.

<sup>335</sup> Lin Y et al „Advances Toward Bioapplications of Carbon Nanotubes“, J. Mater. Chem, 14, 2004, str 527.

<sup>336</sup> Bachilo S.M. et al „Structure-assigned Optical Spectra of Single Carbon Nanotubes“, Science, 298, 2002. str. 2361. O’Connell M.J. et al „, Band Gap Fluorescence from Individual Single-walled Carbon Nanotubes“, Science, 297, 2002, str. 593.

<sup>337</sup> Cherukuri P. et al „Near-infrared Fluorescence Microscopy of Single-walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells“, J. Am. Chem. Soc., 126, 2004, str. 15638.

V uplynulých 10 letech bylo zkoušeno s různými výsledky mnoho druhů přírodních polymerů v kombinaci s nanoHAP s cílem aplikací v biomedicině. Všeobecným problémem je zatím čas potřebný pro stimulaci růstu kosti.

Mezi nadějně nanokompozity patří např. PLA<sup>338</sup> – nanoHAP<sup>339</sup> nebo chitosan-nanoHAP<sup>340</sup>.

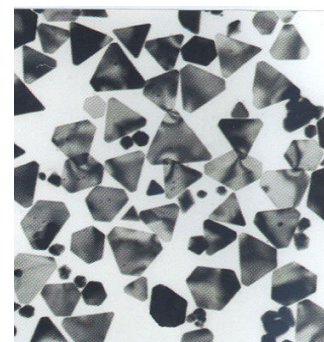
### 5.3.4. NANOČÁSTICE STŘÍBRA

Antibakteriální účinky stříbra znali již staří Římané. Znovu byla tato vlastnost stříbra objevena začátkem dvacátého století. S kovovým stříbrem jsou však problémy. Barví tkáň a znesnadňuje hodnocení zranění. Jeho působení nemá dlouhou životnost a pro udržení antimikrobiálních účinků jsou zapotřebí časté reapplikace. Kovové stříbro je biologicky inertní a prochází přes tělo. Proto se častěji používá **oxid stříbrný** (Ag<sub>2</sub>O). Stříbro zabíjí mikroorganismy. Pozitivně nabitě ionty stříbra jsou pro mikroorganismy vysoce toxické. Stříbro působí na mikroorganismy několika způsoby. Např. má vysokou afinitu k negativně nabitým bočním skupinám biologických molekul, jako jsou sulfohydryl, karboxyl, fosfáty a jiné nabitě skupiny nacházející se v mikrobiálních buňkách. Stříbro současně atakuje místa uvnitř buněk a deaktivuje kritické fyziologické funkce, jako např. syntézu stěn buněk, transport přes membrány, syntézu a translaci nukleových kyselin, skládání proteinů a jejich funkci a rovněž transport elektronů v buňce. Ztrátou těchto funkcí bakterie buď přestane růst nebo většinou je mikroorganismus zabit. Účinky stříbra nejsou selektivní, což má za následek, že stříbro projevuje antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru lékařsky zajímavých mikroorganismů včetně bakterií, hub a kvasinek.

V poslední době se pozornost při hledání způsobu prevence vzniku bakteriálních filmů obrací k nanočásticím Ag<sub>2</sub>O, resp. k jejich uspořádaným souborům zabudovaným (obvykle plazmou) do povrchu lékařských přístrojů a nástrojů<sup>341</sup>. Hlavní účinek souvisí s velkou aktivní plochou povrchu nanočástic, které mají rozměr 5 – 15 nm. Stříbro oxiduje na Ag<sub>2</sub>O na povrchu nanočástic působením vlhkosti, např. z tělních tekutin. Stříbro oxiduje velmi pomalu, čímž se prodlužuje účinek jeho působení.

Jinou technologií je využití stříbrných nanočástic v roztoku. V průběhu použití každá nanočástice stříbra oxiduje buď na vzduchu nebo v tělní tekutině. Na vnějším povrchu se vytváří Ag<sub>2</sub>O, který se postupně v tělní tekutině rozpouští za vzniku Ag<sup>+</sup> iontů, které působí na mikroorganismy.

Nanočástice stříbra jsou komerčně dostupné<sup>342</sup>. Na trhu jsou nabízeny různé výrobky impregnované nanočásticemi stříbra, např. ponožky<sup>343</sup>. Nanočástice stříbra se používají do fasád domů proti řasám i do vnitřních omítek proti plísním<sup>344</sup>, např. v nemocnicích. Typické nanokrystaly stříbra jsou na **obr. č. 72**.



**Obr. č. 72** Nanočástice  
Stříbra

<sup>338</sup> PLA – poly(D,L-laktid)

<sup>339</sup> Deng X. et al „Preparation and Mechanical Properties of Nanocomposites of Poly(D,L-lactide) with Calcium-deficient Hydroxyapatite Nanocrystals“, *Biomaterials*, 22. 2001, str. 2867.

<sup>340</sup> Yamaguchi L. et al „Preparation and Mechanical Properties of Chitosan – Hydroxyapatite Nanocomposites“, *Bioceramics* 13, 2001, str. 673.

<sup>341</sup> Tobler D., Warner L. „Nanotech Silver Fights Microbes in Medical Devices“, *Medical Device & Diagnostic Industry Magazine*, 27, 2005, str. 164

<sup>342</sup> [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com); [www.nanogate.com](http://www.nanogate.com) aj.

<sup>343</sup> [www.nanosilver.cz](http://www.nanosilver.cz)

<sup>344</sup> Schunk B. „Fighting Fungal Growth with Silver“, *Fraunhofer Magazine*, 2/2006, str. 48.

### 5.3.5. DENDRIMERY

**Dendritické polymery** jsou čtvrtá hlavní třída makromolekulární architektury (spolu s lineární, sesíťovanou a rozvětvenou architekturou). Sestávají ze čtyř subkategorii: nahodile „hyper“ rozvětvené, dendrigrafty, dendrony a dendrimery.

**Dendrimery** jsou syntetické, složité kulovité molekuly s velmi dobře definovanou chemickou strukturou, které byly poprvé syntetizovány na začátku osmdesátých let 20. století. Z hlediska polymerové chemie jsou dendrimery téměř dokonalé monodisperzní makromolekuly s pravidelnou a vysoce rozvětvenou trojrozměrnou nebo fraktální strukturou. Skládají se ze tří hlavních stavebních složek: jádra, větví a koncových skupin na periferii (**obr. č. 73**).

Makromolekulární složky se paprskovitě rozšiřují ve formě větvíček z centrálního jádra, čímž vytváří vnitřní dutinu a také okruh koncových skupin, které mohou být přizpůsobeny na míru podle požadavků. Mohou projít póry cév a tkáni účinněji než větší polymerní nanočástice. Mohou být syntetizovány s odpovídající molekulární hmotností, která je významným atributem systémů dodávky léků do organismu, vlivem interakce mezi rozměrem a toxicitou, respektive vlivem akumulace v cílových tkáních.

Dendrimery mají účtyhodnou nosnost 25% w/w. Kationaktivní dendrimery jsou toxické, zatímco aniontové dendrimery jsou biokompatibilní.

Dendrimery jsou pro dopravu léků velmi vhodné, protože jsou dostatečně malé, aby pronikly do buněk a kavity, které se v dendrimerech vyskytují, mohou být použity pro umístění malých molekul léků. Rovněž na větve dendrimery mohou být připojeny molekuly léků a další skupiny – **obr. č. 73**.

Ve srovnání s klasickými polymery, dendrimery vykazují některé významně zlepšené fyzikální a chemické vlastnosti. V roztoku dendrimery vytvářejí těsně napěchovaný míč, čímž jsou ovlivněny jejich rheologické vlastnosti, tj. když se zvyšuje molekulární hmotnost, zvyšuje se na maximum i vazkost až do 4. vývojového stupně a následně pak klesá. Charakter a množství periferních koncových skupin silně ovlivňuje rozpustnost a reaktivitu dendrimery.

Dendrimery s koncovými hydrofilními skupinami jsou rozpustné v polárních roztocích, zatímco dendrimery, které mají hydrofobické koncové skupiny, jsou rozpustné v nepolárních roztocích. Dendrimery nižšího vývojového stupně, které jsou dostatečně velké na to, aby byly kulovité, ale nevytvářejí hustě natěsnaný povrch, mají ohromnou povrchovou plochu ve vztahu k objemu, tj. až do 1000 m<sup>2</sup>/g<sup>345</sup>.

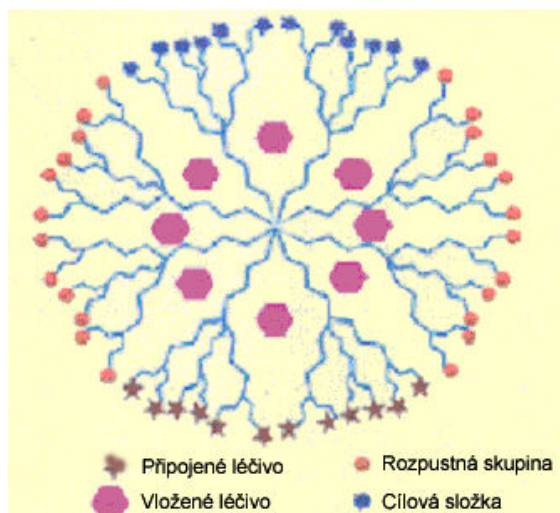
Existence vnitřní dutiny a globulární tvar dendrimery umožňuje opouzdřit různé molekuly, které mohou být zachyceny uvnitř "dendritické schránky". Následně je prostřednictvím chemické reakce koncových skupin vytvořen na povrchu dendrimery plášť a sonda je opouzdřena, čímž se získá molekulární kontejner nanoskopických rozměrů. Otevření schránky se děje pomocí hydrolýzy, prostřednictvím štěpení, které se spouští pH faktorem nebo prostřednictvím fotochemické reakce vnějšího pláště, při níž se uvolňuje dopravovaný obsah. Předpokládá se, že dendrimery budou mít široké použití v lékařství. Při vyšetření *in vitro*, při němž bylo diagnostikováno poškození srdečního svalu, byly dendrimery použity jako kontrastní látka při zobrazení magnetickou rezonancí<sup>346</sup>. Dále byly dendrimery použity jako lokální mikrobicidní materiál účinkující proti infekci způsobené virem herpes simplex<sup>347</sup>, při dopravě léků<sup>348</sup> atd.

<sup>345</sup> Alper J. „Rising Chemical „Stars“ Could Play Many Roles“, Science, 251, 1991, str. 1562.

<sup>346</sup> Wiener E.C. et al „Dendrimer-based Metal Chelates: A New Class of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents“, Magn. Reson. Med., 31, 1994, str. 748.

<sup>347</sup> Bourne N. et al „Dendrimers, a New Class of Candidate Topical Microbicides with Activity against Herpes Simplex Virus Infection“, Antimicrob. Agents Chemother., 44, 2000, str. 2471.

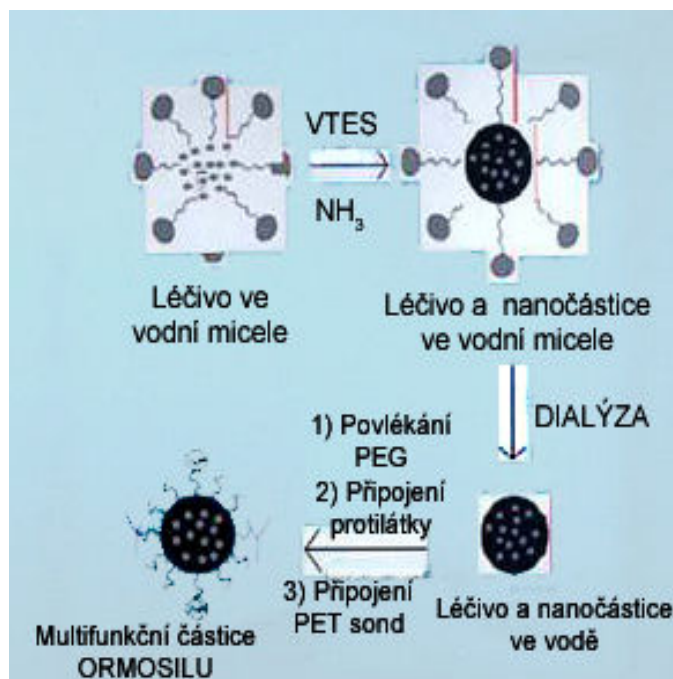
Obr. č. 73 Možnosti připojení různých skupin



### 5.3.6. ORMOSILY

Ormosily jsou anorganicko – organické monomery. Jsou to molekuly obsahující kovové jádro, např. z křemíku, připojené k reaktivním alkoxy skupinám a/nebo organickým skupinám.. Tyto monomery, jsou-li samosestaveny, vytvářejí organicky modifikované silany. Snadno vytváří agregáty ve vodním jádru reverzních micel, kde jsou složky např. trietoxysilanu hydrolyzovány za vzniku sítě z hydrátovaného  $\text{SiO}_2$  a vinylových skupin vyčnívajících na povrch nanočástic směrem k hydrofobní straně povrchu micel. Nanočástice jsou sférické a mají poměrně malý rozptyl rozměrů s průměrem cca  $90 \text{ nm}$ <sup>349</sup>. Částice jsou dále funkcionalizovány různými povlaky, např. PEG. Postup vytvoření funkcionalizované částice Ormosilu jako nosiče léku je znázorněn na obr. č. 74. Nejprve se do vodního jádra reverzní micely umístí dopravovaná látka (lék, fluorofor ap.) – na obr. vlevo nahoře, po přidání prekursoru TEVS (trietoxyvinylsilan) se v micelle vytvoří nanočástice obsahující dopravovanou látku – vpravo nahoře.

Obr. č. 74 Postup vzniku multifunkční nanočástice Ormosil



Po dialýze zůstanou ve vodě pouze nanočástice – vpravo dole. Ty mohou být funkcionalizovány PEG, protilátkami nebo PET sondou (např. Cu) – vlevo dole. Vznikne multifunkční nanočástice Ormosilu. Ormosily byly vytvořeny metodou sol-gel poprvé

<sup>348</sup> Zhou R.X., Lu Z.R. „In vitro Release of 5-fluoroacil with Cyclic Core Dendritic Polymer“, J. Control. Release, 57, 1999, str. 249; Liu M. et al „Water-soluble Dendritic Unimolecular Micelles: Their Potential as Drug Delivery Agents“, J. Control. Release, 65, 2000, str. 121.

<sup>349</sup> Sharma R.K. et al „Surface Modified Ormosil Nanoparticles“, J. Colloid and Interface Sci., 277, 2004, str. 342.

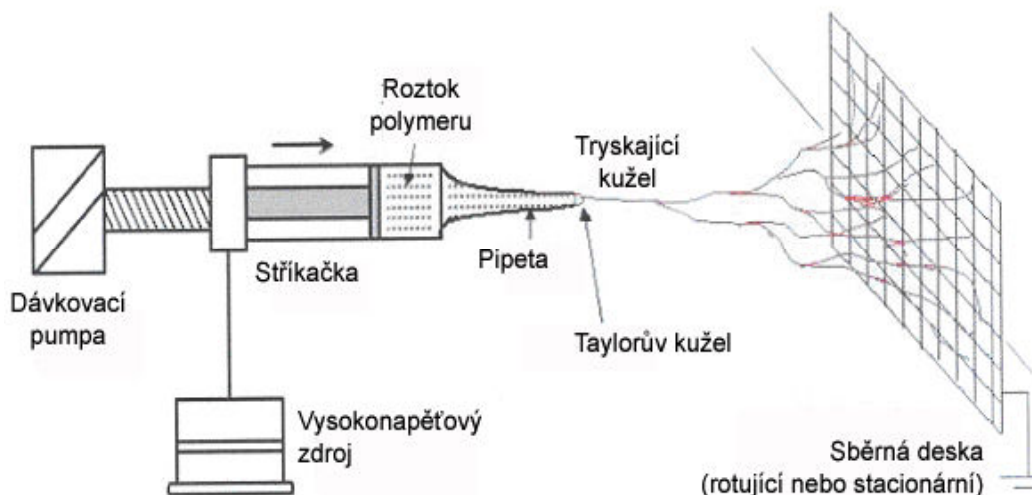
v polovině osmdesátých let minulého století a nejprve se nevědělo, zda jde o skla nebo polymery. Název ORMOSIL (organically modified silicates) použil poprvé H.Scholze<sup>350</sup>.

Ormosily se zdají být vhodné pro řadu použití, např. jako náhrada za virální vektory<sup>351</sup>, pro transport genů s vynikající transfekční účinností<sup>352</sup>, při cíleném zobrazování pozitronovou emisní tomografií (PET), při fotodynamické terapii atd.

### 5.3.7. POLYMERNÍ NANOVLÁKNA

Polymerní nanovlákná je pojem používaný pro označení vláken s průměrem menším než 1  $\mu\text{m}$ . Vlákná se vyrábějí způsobem zvaným *electrospinning*, patentovaným již v roce 1934<sup>353</sup>. Již asi 25 let se polymerní mikrovlákná vyrábějí pro filtrační a jiné účely<sup>354</sup>. Teprve v poslední době se tloušťka polymerních nanovláken přiblížila nanometrické škále (40 – 200 nm).

Electrospinning je proces využívající elektrostatické síly (elektrického pole) pro rozbití zavěšené kapky polymerního roztoku na tenká vlákna, která jsou deponována na substrát. Schéma technologie je na **obr. č. 75** a vyrobená vlákna, ve srovnání s lidským vlasem, jsou znázorněna na **obr. č. 76**. V České republice byl nedávno vyvinut způsob plynulé výroby tkaniny z polymerních nanovláken, která je vhodná pro použití v lékařství, např. jako krycí a obvazový materiál, ve tkáňovém inženýrství (jako nosiče buněk), při cílené dopravě léků a ve filtračních systémech (jako inteligentní filtry s připojenými protilátkami nebo antibakteriální filtry)<sup>355</sup>.



**Obr. č. 75** Schéma technologie „electrospinning“

<sup>350</sup> Scholze H. „New Possibilities for Variation of Glass Structure“, J. Non-Crystalline Solids, 73, 1985, str. 669.  
Schmidt H. „Organic Modification of Glass Structure: New Glasses or New Polymers?“, J. Non-Crystalline Solids, 112, 1989, str. 419.

<sup>351</sup> **Vektor** – v molekulární genetice je to genetický prvek, obvykle bakteriofág nebo plasmid, který do sebe může začlenit část cizí DNA a přenést ji do cizí buňky. Používá se při klonování genů.

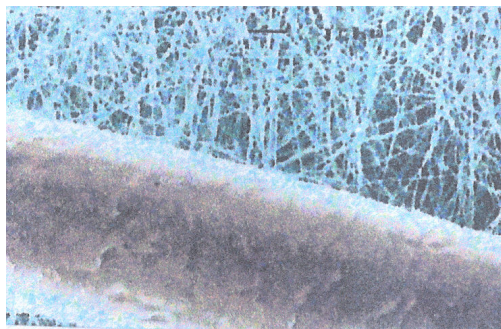
<sup>352</sup> Roy I. et al „Optical Tracking of Organically Modified Silica Nanoparticles as DNA Carriers: A Non-viral Nanomedicine Approach for Gene Delivery“, PNAS, 102, 2005, str.279.

<sup>353</sup> Grafe t., Graham K. „Polymeric Nanofibers and Nanofiber Webs: A New Class of Nanowovens“, INTC 2002 – Int. Nanowovens Technical Conf., Atlanta, GA, Sept. 2002.

<sup>354</sup> [www.donaldson.com](http://www.donaldson.com); [www.nanospin.com](http://www.nanospin.com).

<sup>355</sup> [www.nanospider.cz](http://www.nanospider.cz).

**Obr. č. 76** Tloušťka vláken 20 – 200 nm  
(v popředí lidský vlas)



### 5.3.8. NANOPORÉZNÍ MATERIÁLY

Nanoporézní materiály jsou materiály s póry menšími než 100 nm, i když existují některé zajímavé mikroporézní materiály v submikronové škále (> 100 nm). Obvykle se dělí na objemové a membrány. Podle klasifikace IUPAC mají mezopóry průměr od 3 do 10 nm a makropóry průměr od 50 do 100 nm. Nanoporézní materiály mohou mít otevřené (vnitřně propojené) póry nebo póry uzavřené. Mohou mít amorfní, semikrystalickou nebo krystalickou strukturu. Nanoporézní materiály mohou být vyrobeny z mnoha látek jako je například uhlík, křemík, křemičitany, keramika, polymery a minerály. Materiály specificky určené pro membrány jsou především zeolity (např. přírodní 3D zeolit nazývaný elektrit pro katalytické aplikace) nebo schwartzity. Zásadní vlastností nanoporézních materiálů je jejich zvětšená povrchová plocha, což zlepšuje jejich katalytické, absorpční a adsorpční vlastnosti. Používají se jako molekulární síta, mají nízkou hmotnost a dobré fotonické vlastnosti. V případě objemových nanoporézních materiálů pozorujeme dobré tepelně izolační vlastnosti a index lomu závislé na vlnové délce.

Nanoporézní materiály lze vyrobit s póry o různé velikosti, v různých tvarech a hustotě, a to tím způsobem, že změním podmínky při vzniku pórů. Například nanoporézní křemík je nestálý a lze jej využít jako materiál schopný samovolného biologického rozpadu u lékařských implantátů, včetně produktů tkáňového inženýrství, v podobě podpěry struktury nebo v dodávce léků do organismu. Jejich další potenciální uplatnění lze spatřovat v zlešování životního prostředí a v technologii výroby implantátů.

### 5.3.9. PEG – POLY(ETYLEN GLYKOL)

PEG je pozoruhodný materiál. Není toxický, je biokompatibilní a byl schválen FDA (US Federal Food and Drug Administration) jak pro orální, tak pro lokální aplikace. Nacházíme jej v kosmetických přípravcích, mýdle, biomedicínských přístrojích a lécích. Ačkoliv se komerčně vyrábí po mnoho desetiletí a je ve značné míře prozkoumán, pokračuje se ve zjišťování ve vztahu k bioaktivitě povrchů a objemových materiálů. Používá se i jako biointeraktivní nanohydrogel.

PEG - monomer etylen glykolu má jednoduchou strukturu se vzorcem  $C_2H_4O$ . Jeho uhlovodanový charakter způsobuje, že je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech (např. v dichlormetanu nebo tetrahydrofuranu) a jeho eterový kyslík se může vázat na vodu, což činí PEG rozpustný ve vodních roztocích. Hydrofilický charakter PEG je využíván ve fyziologických systémech. Je-li přítomen na povrchu, snižuje adsorpci proteinů a adhezi buněk. PEG má mnoho strukturních, chemických a fyzikálních vlastností blízkých extracelulární matrix v buňce. PEG se používá a stále zkoumá pro využití v úpravě povrchů a objemových materiálů v biomedicínských aplikacích jak *in vitro* tak *in vivo*, v cílené dopravě léků do organismu a tkáňovém inženýrství.

## 5.4. BIOTECHNOLOGIE, FARMACIE A NANOTECHNOLOGIE

Hnací silou rozvoje farmacie se postupně stávají biotechnologie, a proto hovoříme o biofarmacii. Tradiční chemické paradigma objevování a vývoj léků je zaměňováno novým, biotechnologickým paradigmatem. To má významný vliv na strukturu a činnost biofarmaceutického inovačního systému: klíčovými hráči generujícími nové znalosti, nástroje a látky pro farmaceutický průmysl se stávají biotechnologické společnosti (většinou s globální působností) a organizace veřejného sektoru.

Farmaceutický průmysl dnes představuje velmi rozvinutý obor s vysokým stupněm koncentrace, který v rozsáhlé míře podporuje výzkum nových léků a způsobů léčení. Značné prostředky na totéž jsou vynakládány z veřejných rozpočtů jednotlivých států. Odhaduje se, že polovina z 50 mld. USD světového rozpočtu na farmaceutický výzkum se utratí v USA a 16 mld. USD v Evropě. I když je stále možné objevit nový účinný lék náhodou (jako (penicilín), nebo prošetřováním a tříděním (screeningem) přírodních látek (např. digoxin izolovaný z náprstníku lékařského pro aplikaci při infarktu myokardu), v poslední době se stále více používá kombinatoriální chemie<sup>356</sup>. Při znalosti příčin a průběhu nemoci se doposud úspěšně používaný lék může chemicky modifikovat, aby byl ještě účinnější, bezpečnější a snadněji použitelný. Je však skutečností, že farmaceutický průmysl sleduje v současné době stále empirickou cestu vývoje nových léků. Po pochopení mechanismu onemocnění se syntetizuje určitá látka, vyhodnocuje se její schopnost interakce s receptorem (targetem)<sup>357</sup> a sledují se účinky na průběh nemoci. Tato metoda je označována jako „jeden lék, jedna choroba“, při které se farmaceutické společnosti snaží vytvořit tzv. „blockbuster drug“, která by přinesla výnos min. 1 mil. USD ročně. V posledních létech je však nabízeno stále menší množství nových léků připravených touto metodou<sup>358</sup>.

Rozdělení celkového trhu s farmaky mezi generické léky, „blockbuster“ léky a systémy dopravy léků v roce 2002 je zřejmý z **obr. č. 77**<sup>359</sup>. Nové přístupy k vývoji nových léků (biotechnologie) se objevily s úspěšným sekvencováním lidského genomu a s rozvojem farmakologie, farmakogenetiky, genomiky a proteomiky (vysvětlení pojmů - viz – **Tab. č. VI.**)

Ve farmaceutickém inovačním procesu hrají biotechnologie dvojí roli:

- Jsou jednou z klíčových oblastí biofarmaceutického a biomedicínského výzkumu, protože významně přispívají k objasnění regulačních a fyziologických mechanismů nemocí (významný příspěvek v této oblasti se očekává z výzkumu lidského genomu).
- Mají rozhodující význam pro výzkum, vývoj a výrobu nových farmaceutických produktů, zejména biofarmak, vakcín a pro diagnostických nástrojů a metod.

V posledních letech se v biofarmacii, při vývoji nových léků a zejména při jejich dopravě v organismu, rýsují i možnosti uplatnění nanotechnologií. Jejich aplikace je na samém počátku, ale výzkumné práce probíhají velmi intenzivně<sup>360</sup>. V této kapitole budou popsány základní východiska důležitá v současné době pro vývoj nových léků a jejich dopravu v organismu, základní postup při vývoji léků, používané a nově se rýsující způsoby dopravy léků v organismu a možnosti nanotechnologií v uvedených oblastech.

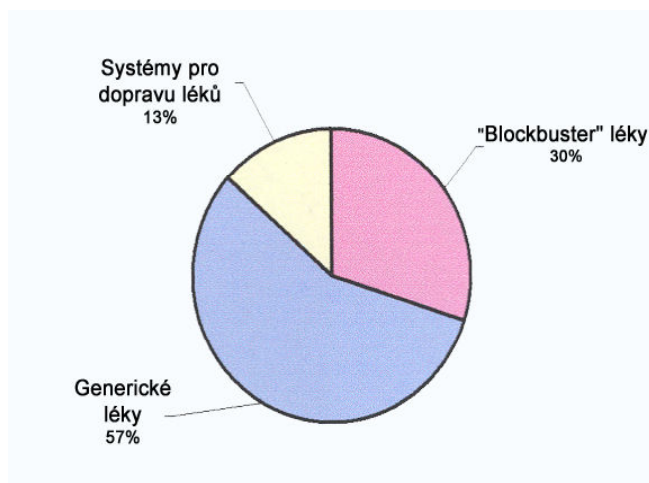
<sup>356</sup> **Kombinatoriální chemie** – chemické látky jsou systematicky modifikovány tak, že vzniká množství jejich variant, které jsou tříděny podle jejich působení na vybraný target

<sup>357</sup> **Target (receptor)** – molekula uvnitř buňky nebo na jejím povrchu, ke které se selektivně váže látka (lék), která způsobí změnu aktivity buňky. Targety ve farmacii jsou často přírodní proteiny v těle.

<sup>358</sup> Morrison M.: „Drug Discovery“, kap. 3, „Nanotechnology and its Implications for the Health of EU Citizen“, ed. by M.Morrison, 12/2003, str. 43, [www.nanoforum.org](http://www.nanoforum.org)

<sup>359</sup> Guibert J.-Ch.: „Drug Delivery“, kap. 4, „Nanotechnology and its Implications for the Health of EU Citizen“, ed. by M.Morrison, 12/2003, str. 76, [www.nanoforum.org](http://www.nanoforum.org)

<sup>360</sup> Jain K.K. „Nanobiotechnologies – Applications, Markets and Companies“, vyd. Jain Pharma Biotech Comp., 6/2006, [www.pharmabiotech.ch](http://www.pharmabiotech.ch).



**Obr. č. 77** Rozdělení trhu s farmaky v roce 2002

**Tab. č. VI.**

Vybrané definice<sup>361, 362</sup> :

- **Farmakologie** – vědní obor studující interakci látek a léčiv (farmak) s biologickými systémy. Je jí třeba odlišit od farmacie, která se zabývá výzkumem, výrobou, kontrolou a distribucí farmak.  
Farmakologie se rozděluje na řadu podoborů (neúplný výčet):  
Obecná farmakologie – studují se obecně platné zákonitosti, jimiž se řídí interakce organismu a farmak  
Speciální farmakologie – zabývá se konkrétními skupinami léčiv a individuálními látkami v těchto skupinách. Tvoří teoretický základ znalostí pro terapeutické použití jednotlivých léčiv.  
Farmakoterapie – poskytuje návody postupů k léčbě určitých onemocnění a dávkování léků u různých chorobných stavů  
Klinická farmakologie – zkoumá účinky farmak přímo u subjektů, u kterých mají být léčiva použita  
Toxikologie – studuje vedlejší, nežádoucí a toxické účinky farmak  
Základními oblastmi farmakologie jsou:
  - **Farmakokinetika** – se zabývá osudem léčiv v organismu, tj. adsorpcí, distribucí, metabolismem, eliminací (zkráceně ADME) a časovým průběhem koncentrace léčiva v biologických tekutinách.
  - **Farmakodynamika** – je nauka o mechanismech účinku léčiv. Sleduje jak se léčiva chovají v organismu a je základem farmakologie.
 Další definice:
  - **Farmakogenetika** – obor studující závislost účinků léčiv na genetických faktorech
  - **Farmakogenomika** – je součástí farmacie zabývající se vlivem genetických variací na odezvu léků u pacientů porovnáváním genové exprese nebo polymorfizmu jednoho nukleotidu (SNP) s účinností nebo toxicitou léku. Cílem farmakogenomiky je vývoj racionálních prostředků pro optimalizaci léčby, s ohledem na pacientův genotyp. Takové přístupy naznačují začátek personalizované medicíny.
  - **Chemogenomika** – se zabývá genomickou odezvou na chemické sloučeniny. Cílem je rychlá identifikace nových léků a targetů léků zahrnující ranné fáze objevování léků, od identifikace targetů a jejich prověřování, přes upřesňování složení sloučenin a jejich chemickou syntézu, po biologické zkoušky a ADME profilování.

<sup>361</sup> „Akademický slovník cizích slov“, vyd. Academia, Praha, 1995, ISBN 80-200-0497-1

<sup>362</sup> Hynie S. „Farmakologie v kostce“, 2. vydání, Triton, Praha, 2001, ISBN 80-7254-181-1.



### 5.4.1. PŘÍSPĚVEK BIOTECHNOLOGIÍ K FARMAKOLOGII A FARMACII

Hlavní příspěvek biotechnologií k farmakologii a farmacii lze najít ve výzkumu lidského genomu, diagnostice, terapeutice, farmakogenetice a výzkumu a vývoji vakcín a protilátek.

#### 5.4.1.1. Výzkum lidského genomu

Výzkum lidského genomu byl iniciován v USA v roce 1990 Ministerstvem energetiky a Národním ústavem zdraví (Human Genome Project). Připojily se další země a v roce 1998 i soukromý sektor, což značně urychlilo postup sekvenování. Návrh sekvencí lidského genomu byl publikován v roce 2001. Návrh pokrývá cca 90 % euchromatických částí genomu; každý pár bazí byl v průměru sekvenován čtyřikrát. Celkově obsahuje lidský genom  $3,2 \times 10^9$  stavebních prvků. Překvapivým výsledkem bylo zjištění, že lidský genom obsahuje jen 30 – 40000 genů, Tento výsledek vedl k představě, že složitost lidského těla není určena výhradně určitým počtem různých genů, ale mnohem složitějším procesem genové exprese.

Po objasnění lidského genomu je dalším problémem identifikace genů a jejich funkce, což je důležité pro využití genetických informací v biofarmacii.

Mapování lidského genomu také pomohlo identifikovat důležité markery genetické diverzity, které mohou být relevantní při pátrání po genech způsobujících choroby. Konkrétně se jedná např. o polymorfismus jednotlivých nukleotidů (SNP). SNP jsou mutace v jednom nukleotidu, které mohou zvyšovat riziko určité poruchy. Ukázalo se, že genetický materiál představuje dynamický, nikoliv statický systém. K mutacím dochází spontánně v průběhu replikace DNA nebo je vyvolávají exogenní vlivy, např. radiace. Mutace jsou zřejmě časté. Korektivní mechanismy uvnitř buňky jich však většinu opraví. Jen část mutací přetrvává a jen část perzistujících mutací může způsobovat specifické choroby (např. rakovinu, která je častější u pacientů vystavených radiaci).

#### 5.4.1.2. Diagnostika

Jsou dvě základní strategie diagnostiky založené na biotechnologii – imunodiagnostika a DNA diagnostika.

Imunodiagnostika je založena na velmi specifické interakci mezi protilátkami (imunoglobuliny - Ig) a antigeny. Použitím radioaktivních, fluorescenčních aj. markerů je možná detekce určité imunitní reakce. Novější metody kombinují pro zvýšení citlivosti imunoreakce a DNA amplifikaci. Imunologické testy jsou využívány k identifikaci specifických protilátek nebo antigenů, aby se indikovaly určité podmínky nemoci, jako např. virová či bakteriální infekce nebo rakovina.

DNA diagnostika souvisí se specifickou strukturou DNA molekuly a její schopností denaturovat a opět hybridizovat – viz 5.1.6.4.. Základního principu DNA diagnostiky se využívá v DNA mikrosouborech. V tomto případě se však vazebné reakce neprovádějí v roztoku, ale na pevném povrchu. Mikrosoubory dovolují současnou detekci tisíců genů.

Výzkum genomu má velký vliv na DNA diagnostiku, protože je k dispozici stále vzrůstající počet s nemocí souvisejících genů a jejich modifikací, což je využíváno pro vytváření specifických diagnostických souprav (např. soupravy pro detekci určitého druhu rakoviny, AIDS, změn enzymů v játrech atd.).

#### 5.4.1.3. Terapeutika

Genetické inženýrství umožňuje vyrobit cizí protein z vyššího organismu v mikroorganizmech nebo buněčných kulturách. Tento základní princip se používá v proteinové terapii. Významným příkladem tohoto postupu je výroba lidského inzulínu. Geny pro tento protein se

extrahují z lidského genomu a přenáší se do bakterie nebo buňky kvasinek. Oba postupy umožňují expresi lidského inzulinu, který může být po vyčištění a modifikaci použit jako farmakum. Jiná velmi zajímavá farmaka na trhu jsou erythropoietin, růstový faktor, interferony a plasminogenové tkáňové aktivátory (TPA). Novou skupinou produktů jsou biofarmaka založená na monoklonálních protilátkách.

Ve srovnání s biovýrobou farmak se aplikace biotechnologií jeví významnější při jejich výzkumu a vývoji. Zdá se, že je to hlavní síla při inovacích ve farmaceutickém průmyslu vedoucí, jak již bylo uvedeno, k posunu paradigma při vývoji léků. Schéma nového přístupu k objevování léků zahrnujího molekulární biologii, biotechnologie a farmakogenetiku je na **obr. č. 78**<sup>363</sup>. Na postupovém diagramu je znázorněn i klasický – chemický přístup. Celkově je objevování nových léků složitý proces vyžadující komplexní znalosti a součinnost mnoha oborů (biochemie, kombinatoriální chemie, automatizace, robotiky, bioinformatiky, lékařské chemie, farmakologie) a dalších, na obrázku neuvedených oborů.

Vzrůstající počet nových targetů léků byl detekován z informací získaných při sekvenování lidského genomu. Jen malá část z 30-40000 lidských genů může být zajímavými targety léků. Je to však odhadem 3000-10000 nových targetů, což je ve srovnání se stávajícím počtem vzrůst o jeden řád. Vzrůstající počet potenciálních targetů léků zmiňuje významné úzké místo při objevování léků, současně to přináší nový problém, a tím je prověřování targetů. Prověřený target je ten, jehož zpracování s terapeutickou látkou vede k žádaným klinickým výsledkům. Screening užitečnosti nového targetu se dnes provádí s vysokou produktivitou (automaticky 10000 a více testů týdně).

#### **5.4.1.4. Farmakogenetika**

Farmakogenetika je studium polymorfismů v genech, který mají nepříznivý vliv na reakci jednotlivce na podaný lék. Informace získané při tomto studiu přispívají k účinnějším klinickým testům. Dlouhodobým cílem farmakogenetiky je rozvoj zákaznické či personalizované medicíny. Identifikací genetické jedinečnosti pacienta by měly být zpřesněny léčebné postupy. Je třeba poznamenat, že tento přístup vyžaduje genetické informace o pacientovi a z toho plynoucí zodpovědné zacházení s nimi. Personalizovaná medicína je ožehavým tématem současnosti.

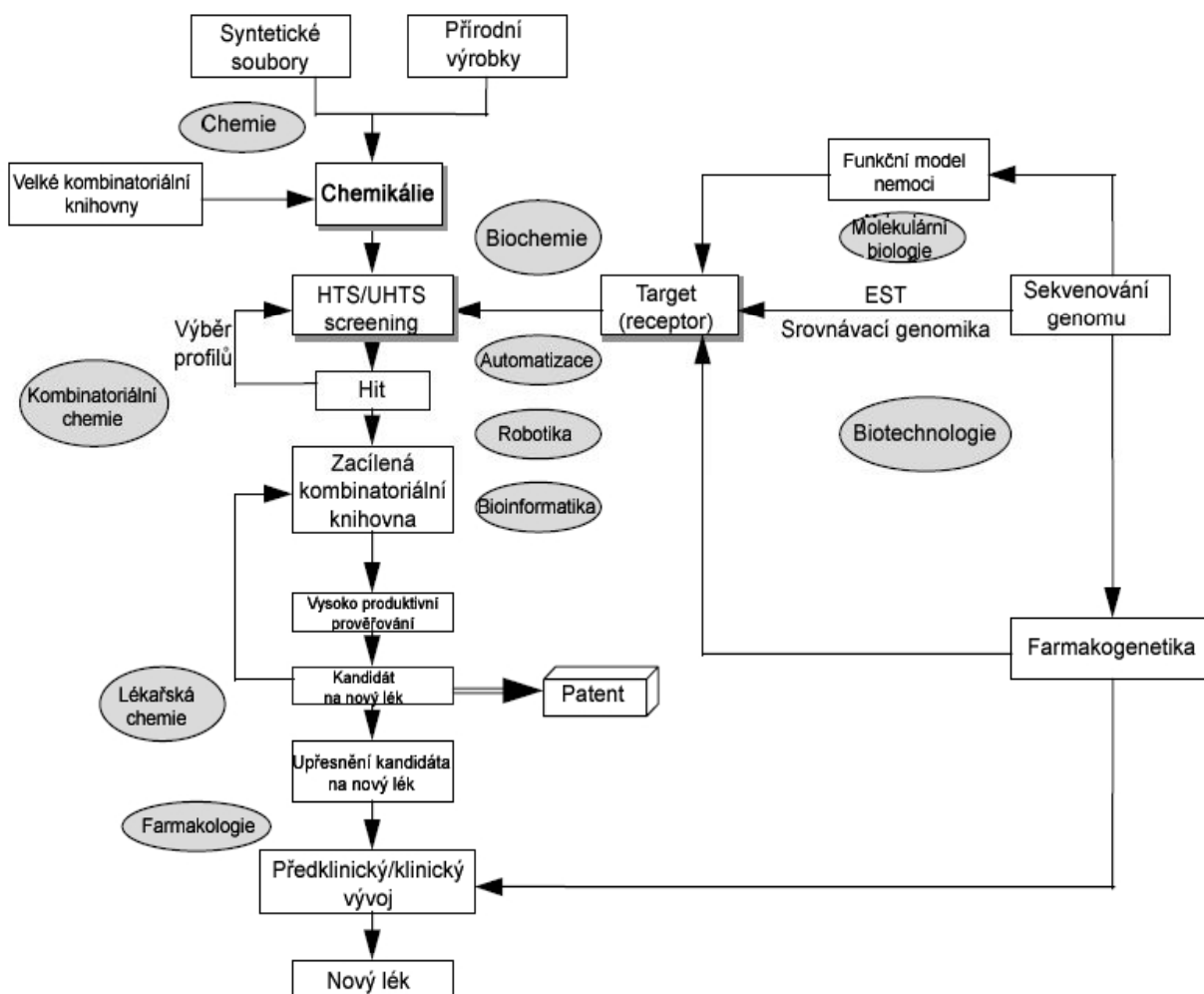
#### **5.4.1.5. Vakcíny a protilátky**

Soudí se, že vakcíny se staly nejsilnějším nástrojem zdravotní péče ve 20. století. Slouží jak při prevenci nemocí, neschopnosti a smrti, tak při snižování nákladů na nezbytnou léčbu. Ačkoliv byl při vakcinaci dosažen velký úspěch (např. celosvětové vymícení pravých neštovic), zůstávají značné problémy s infekčními nemocemi, které jsou celosvětově zodpovědné za nejvyšší počet úmrtí. Není k dispozici účinná vakcinace např. proti tuberkulóze a malárii a objevují se nové nemoci. Navíc, všeobecně vzrůstá antimikrobiální rezistence.

Biotechnologie nabízejí nová řešení. Vyvíjejí se např. nové vakcíny založené na využití specifických částí proteinů - původců infekcí, vyrobené s využitím genetického inženýrství. Dostupnost sekvencí genomů vzrůstajícího počtu mikroorganismů poskytuje příležitosti pro vývoj nových antibiotik.

---

<sup>363</sup> „Innovation in Pharmaceutical Biotechnology: Comparing National Innovation Systems at the Sectoral Level“, zpráva OECD, 2006, str. 27, ISBN 92-64-01403-9.



Obr. č. 78 Nové paradigma objevování nových léků

## 5.4.2. SOUČASNÁ PRAXE PŘI OBJEVOVÁNÍ NOVÝCH LÉKŮ

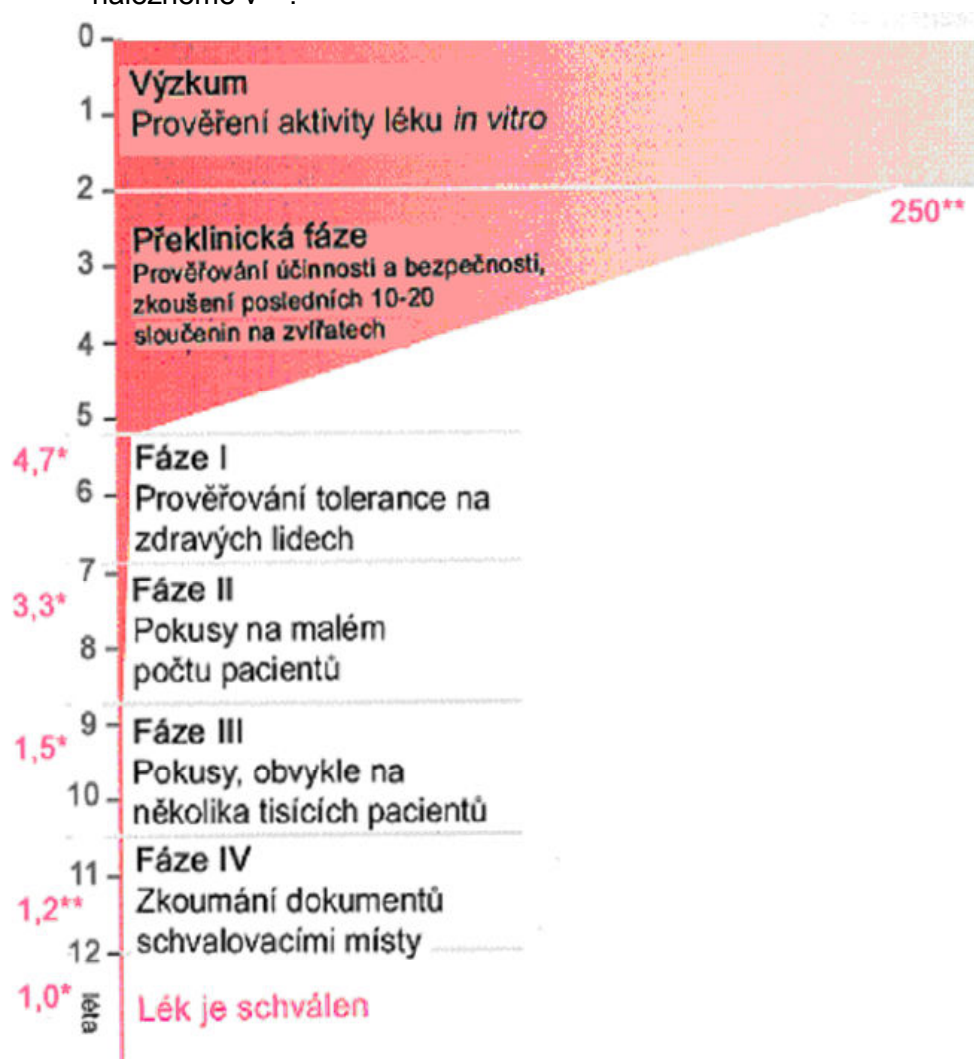
V současné době je známo přibližně 30000 nemocí a lékaři mohou nabídnout přiměřené léčení jen asi jedné třetiny<sup>364</sup>. Výzkum a vývoj nových léků a způsobů léčení je dnes vysoce riziková záležitost. Je stále obtížnější a dražší vyvinout novou účinnou látku. I když investice do výzkumu léků stále rostou a základní výzkum dosáhl nepopíratelných výsledků, počet nových léků povolených k používání stále klesá. V letech 2000-2002 byl celosvětově vydán nejmenší počet povolení na prodej nových léků za posledních 10 let. V roce 2002 schválil americký Úřad pro potraviny a léčiva pouhých 17 skutečně nových léků<sup>365</sup>. Mohou za to zejména přísnější pravidla a regulační opatření zaměřená především na podání důkazů, že nové léky nemají vedlejší účinky. Je to i proto, že vývoj nového léku trvá v průměru cca 12 let, než je uveden na trh. Cena tohoto vývoje se odhaduje na 800 mil. USD pro jeden lék. Z každých 5000 – 10000 navržených sloučenin pouze cca 5 se dostane do etapy klinických zkoušek a pouze jedna získá povolení k používání.. Proces vývoje léku od výzkumu k jeho schválení pro klinickou praxi je znázorněn na **obr.č. 79**<sup>309</sup>.

Prvá fáze, výzkum nového léku určité choroby, se odhaduje na dva roky, přičemž je vytvořeno a analyzováno 5000 – 10000 látek. Do stádia předklinických zkoušek, které se

<sup>364</sup> Miller F.: „Better Medication Sooner“, Fraunhofer Magazine, 1/2005, str.8.

<sup>365</sup> [www.zdn.cz](http://www.zdn.cz), 18.9.2003 (zpráva ČTK)

provádějí na zvířatech a které může trvat až 3 roky, se dostane pouze cca 250 látek. V průběhu předklinických zkoušek je vyřazeno v průměru 80 – 90 % látek, takže do první fáze klinických zkoušek, které se provádějí na omezeném počtu 20 - 30 zdravých pacientů a sledují se jejich reakce, se obvykle dostane 10 – 20 látek. Podle statistiky VFA<sup>366</sup> uspěje v první fázi klinických zkoušek, která trvá asi 2 roky, jen 4,7 látek. Druhou klinickou fází testování o trvání necelých 2 let a prováděnou na 100 – 300 nemocných pacientech, projde úspěšně v průměru 3,3 látek. Třetí fáze zkoušek, které se provádějí na 1000 – 6000 nemocných pacientech, trvá obvykle asi 1,5 roku a projde jí úspěšně v průměru 1,5 nového léku. V průběhu této fáze se již obvykle zahajuje výroba léku. Dokumentace o nových léčích je předložena schvalovacím orgánům k posouzení. Tento proces netrvá déle než 9 - 15 měsíců. Po 10 - 12 letech práce je schválena v průměru 1 látka jako doporučený lék proti dané nemoci. Vysvětlení základních pojmů při interpretaci výsledků klinických zkoušek nalezneme v<sup>367</sup>.



**Obr. č. 79** Proces vývoje léku od výzkumu po jeho schválení pro klinickou praxi

Tato situace, projevující se v USA, EU i v dalších zemích, je zneklidňující, a proto se hledají jednak příčiny tohoto jevu, jednak cesty jak zlepšit celý proces vývoje léků. Americký Úřad pro potraviny a léčiva (FDA) vidí příčiny v zaostávání aplikovaného výzkumu a vývoje a předpokládá za nezbytné zlepšit, zkvalitnit a zrychlit celý proces výzkumu a vývoje nových léků<sup>368</sup>.

<sup>366</sup> VFA – Verband Forschender Arzneimittelforscher, e.V., www.vfa.de

<sup>367</sup> Svobodník A., Coufal D., Dušek L. „Základní pojmy v designu, analýze dat a interpretaci výsledků klinických hodnocení léčiv“, Klinická onkologie, 18, Supplement 2005, str. 238.

<sup>368</sup> „Innovation, Stagnation: Challenge and Opportunity on Clinical Path to New Medicinal Products“, FDA White Paper, 3/2004, www.fda.gov

Jak bylo uvedeno, odhaduje se, že prvých 5 let probíhá jednak výzkum nových látek, které by mohly být účinné proti určité chorobě nebo proti jejím některým projevům, jednak laboratorní předklinické zkoušky. Produktivita výzkumu a vývoje nových léků je dnes klíčovým problémem farmaceutického průmyslu. V České republice upravuje výzkum a proces registrace nových léků zákon č. 79/1997 Sb. „Zákon o léčivech“.

### 5.4.3. STRUČNÝ POPIS POSTUPU PŘI OBJEVOVÁNÍ NOVÝCH LÉKŮ

Co ovlivňuje výzkum a vývoj nových farmak a diagnostických systémů? Jsou to především čtyři oblasti:

- Globální problémy (pandemie, AIDS, hlad ap)
- Vliv vědy a jejích poznatků (tzv. tlak vědy)
- Vliv trhu a ekonomických stimulů (konkurence výrobců, podíl na trhu apod.)
- Vliv nastupujících vědeckých směrů a technologií (molekulární biologie, farmakogenomika, proteomika, nanotechnologie apod.)

V současné době je nashromážděno obrovské množství poznatků o mechanismech různých nemocí, je rozluštěn genetický kód člověka a probíhá výzkum role proteinů v organismu, jsou vytvořeny modely nemocí, terapeutické strategie, k dispozici je rozsáhlá informační infrastruktura (knihovny látek připravených metodami kombinatoriální chemie, knihovny targetů, banka struktur proteinů apod.), vysoce výkonné počítačové systémy a komerčně jsou dostupná automatická a robotizovaná analytická a experimentální pracoviště. Současné metody umožňují studovat biomolekulární struktury na atomové a molekulární úrovni (rtg. krystalografie, nukleární magnetická rezonance, elektronová skenovací, transmisní a sondová mikroskopie atd.). Rozvinulo se molekulární modelování. Výzkum a vývoj farmak dosáhl oblasti nanometrů.

Komplikovaný proces výzkumu a vývoje nového léku znázorněný na **obr. č. 78** je ve zjednodušené podobě naznačen na **obr. č. 80**<sup>369</sup>. Představuje jak chemický (chemogenomický), tak biologický (farmakogenomický) přístup (viz šipky k HITY).

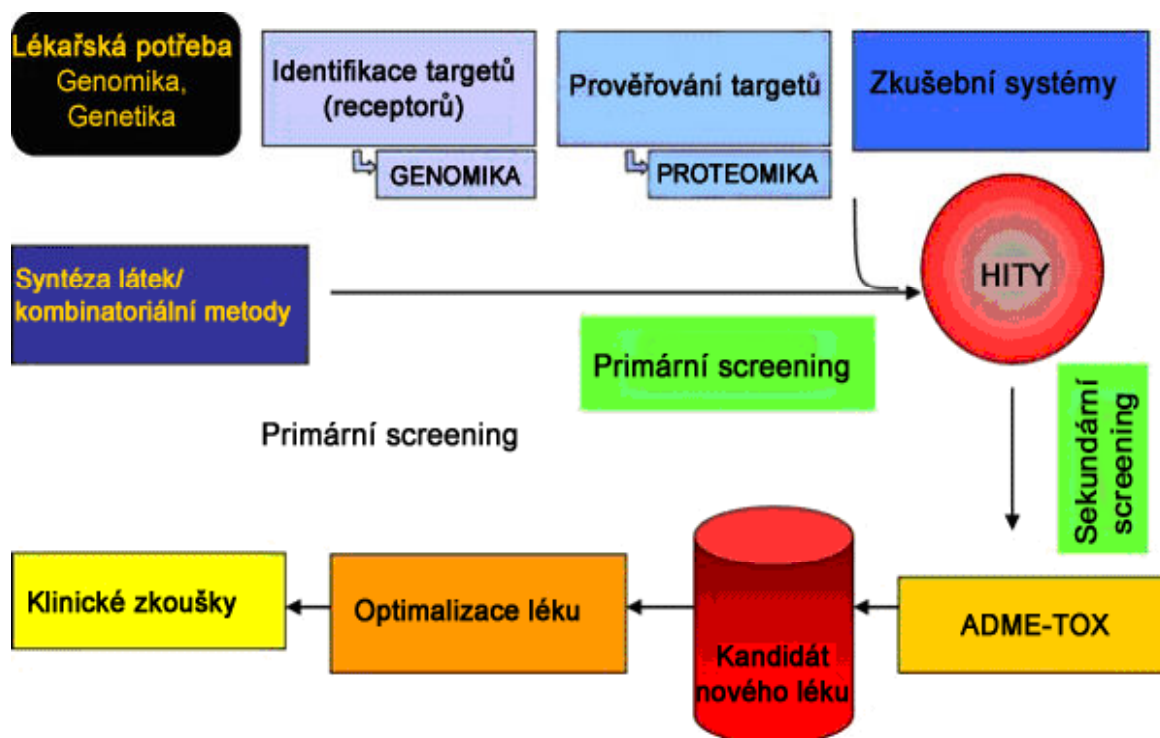
#### 5.4.3.1. Syntéza látek

Objev nového léku často začíná hypotézou, že na rozvoj určité nemoci působí určitý protein a tudíž, že látka, která blokuje nebo brzdí činnost tohoto proteinu bude mít léčebné účinky. Hledání takové látky obvykle začíná screeningem skupiny molekul, aby se našly právě ty látky (říká se jim hity), které brzdí funkce targetu. Tyto „hity“ jsou dále zlepšovány metodami lékařské chemie vytvářením „kvalitnějších“ molekul, které jsou pak zkoušeny na zvířecích modelech nemocí, aby se zjistilo, zda mají příznivý terapeutický účinek. Molekuly, které měly při zkouškách na zvířecích modelech příznivý účinek, jsou dále optimalizovány, aby se staly léky s očekávanými vlastnostmi. Nakonec jsou s těmito léky prováděny klinické zkoušky na lidech. Syntéza látek předpokládá řadu operací: syntézu a čištění látek, jejich charakterizaci, řešení problémů skladování atd. Syntéza je dnes do značné míry automatizována.

Rozsah souborů látek byl velmi rozšířen využitím metod kombinatoriální chemie. Pokrok v automatizaci vysoko výkonného prověřování (high-throughput screening - HTS) pak umožnil screening knihoven obsahujících miliony látek. Nehledě na tento pokrok, je HTS omezeno počtem komplexních, plně vyvinutých látek, které mohou být v praxi vyrobeny a skladovány. V současné době se stále hledají nové látky a zkoumají se jejich možnosti účinně působit na targety.

---

<sup>369</sup> www.tecan.com



Obr. č. 80 Zjednodušené schéma procesu výzkumu a vývoje nového léku

#### 5.4.3.1.1. Knihovny biologických látek

Knihovny biologických látek je pojem, který se během velmi krátké doby vžil v oblasti studia interakcí protein-protein, peptid-protein, oligonukleotid-protein, nukleová kyselina-protein. Pojem „knihovna“ však platí zcela obecně pro interakci libovolná chemicky definovaná látka - libovolný studovaný biosystém. Před objevením tohoto metodologického postupu se běžně strukturně-aktivitní studie opíraly téměř vždy o tzv. klíčové sloučeniny (volně z angl. lead compounds) se známou aktivitou v pozorovaném systému. Od klíčových struktur byly a stále ještě jsou, často empiricky, odvozovány různé deriváty. Biochemické testy vytřídí ty nejúspěšnější, až nakonec zůstane jedna nebo několik málo farmakologicky účinných látek. Stovky neúspěšných kandidátů jsou však syntetizovány, čistěny, charakterizovány a testovány se stejným úsilím a stejnými náklady jako ty úspěšnější. Koncepce knihoven biologických látek se stala důležitým, kvalitativně zcela novým nástrojem pro vyhledávání perspektivních látek, který pomáhá omezit tuto neproduktivní část vývoje nových léků.

Z hlediska použitelnosti knihoven lze vymezit dvě hlavní oblasti:

- Mapování epitopu protilátek<sup>370</sup>, vazebných míst na receptor, vazba enzym-substrát, tj. knihovna je zde nástrojem k poznávání přirozených interakcí, slouží k "ohmatání" biologického systému.
- Vyhledávání nových perspektivních léčiv. V tomto případě knihovna slouží k nalezení optimálních struktur pro cílené zásahy do organismu a jeho funkce.

<sup>370</sup> **Epitop** - též antigenní determinanta, je oblast v molekule makromolekulárního antigenu, na níž se váže protilátka (resp. která vyvolává její tvorbu).

Podstatou knihoven je interakce velkého, náhodně vzniklého souboru biologických látek s biosystémem a vyhledání těch látek z této knihovny, které jsou za interakci odpovědné. Pokud se v souboru látek vyskytuje aktivní komponenta silně interagující s biosystémem, může být vhodným detekčním systémem nalezena, izolována a posléze identifikována.

Klíčovým jevem je interakce s biosystémem (např. navázání protilátky na peptid s vhodnou aminokyselinovou sekvencí, epitopem).

V případě peptidových knihoven je jejich nedostatkem vysoká biodegradabilita synteticky připravených peptidů. I peptid s vysokou aktivitou v testu s biochemickým systémem *in vitro* je obvykle v reálném prostředí v organismu enzymaticky štěpen, neprojde důležitou membránou nebo vyvolá nežádoucí imunitní reakci. Proto důležitým trendem v aplikaci knihoven pro vývoj léčiv jsou knihovny tzv. nepeptidových struktur.

Vývoj farmakologicky užitečných látek buď směřuje od peptidů k nepeptidům (po otestování knihovny je sekvence s vysokou aktivitou modifikována tak, aby byla zvýšena její stabilita a zároveň nebyla snížena její aktivita), nebo k přípravě knihoven látek jiných než peptidových. Cesta od peptidové struktury k nepeptidové je i nadále velmi rozšířená a tvorba analogů peptidů, např. pomocí redukované peptidové vazby, syntetických aminokyselin atd., je stále úspěšná<sup>371</sup>.

#### 5.4.3.2. Identifikace receptorů (targetů)

Většina targetů jsou proteiny. Jak bylo uvedeno v části 4.2.2., jsou proteiny makromolekuly, které provádějí většinu buněčných funkcí: slouží jako stavební kameny buněčných struktur, mohou fungovat jako enzymy, které katalyzují chemické reakce, regulují genovou expresi, umožňují buněčný pohyb a vzájemnou komunikaci. Vlastnosti a funkce buněk, které tvoří tkáň, jsou převážně určovány proteiny. Na rozdíl od genů, kterých je v lidském organismu asi 30-40000 a zůstávají v závislosti na různých okolnostech neměnné (např. při stárnutí), proteinů bylo identifikováno statisíce. Proteiny podléhají v těle neustále různým změnám a proto je jejich charakterizování obtížné. Jak geny, tak proteiny kódují biologické informace.

Lidské proteiny mohou být buď defektní nebo abnormální po expresi, nebo proteiny mohou být uvnitř patogenních činitelů<sup>372</sup>. Místo interakce léku s targetem je často aktivní místo proteinu. Identifikace potenciálního proteinu – targetu uvnitř buňky je velkým problémem moderního vývoje léků, a proto je významným nástrojem prošetřování (screeningu) proteomu<sup>15</sup>. Velké potíže při identifikaci targetů činí separace a detekce proteinů.

Zrychlení identifikace targetů přinesla stále se vyvíjející technologie uspořádaných mikrosouborů (microarrays). Tato technologie, původně použitá pro dekódování lidského genomu, se s úspěchem používá pro řadu jiných účelů (při studiu citlivosti nemocí, při provádění diagnóz, při monitorování rozvoje nemocí, při toxikologických výzkumech, při monitorování dávkování léků atd.). Ještě před deseti léty používalo technologii mikrosouborů jen několik málo pracovišť. Dnes využívá a dále rozvíjí tuto technologii tisíce organizací a akademických pracovišť při výzkumu i výrobě produktů. Při identifikaci targetů se používá především mikrosouborů DNA, mikrosouborů proteinů (proteinové čipy) a mikrosouborů

<sup>371</sup> Rinnová M. „Knihovny struktur“, Bulletin České společnosti chemické, roč. 25, 1994, č. 4.

<sup>372</sup> **Patogenní činitel** – činitel chorobného původu

malých molekul<sup>373</sup>. Podrobnější informace o technologii mikrosouborů je uvedena v části 5.1.6.5.

#### 5.4.3.3. Prověřování targetů

Je-li identifikován target, je třeba zjistit, zda je přizpůsobitelný k intervenci nemoci a zda je to jediný faktor nemoci, či je to část komplexního projevu diferencíální exprese proteinu. Prověření správnosti identifikace targetu je důležitá etapa vývoje nového léku. Ukáže-li se až při klinických zkouškách, že nový lék je nefunkční nebo nebezpečný, je to většinou přímý důsledek nedbale nebo příliš rychle provedeného prověření správné identifikace targetu. Nesprávně identifikovaný target může mít za následek nejen promarnění dlouhé doby testování léku, ale i ztrátu velkých finančních prostředků.

Tradičně se targety prověřují *in vivo* (na modelovém živém organismu - např. je to bakterie *Escherichia coli*, pekařské kvasnice, hmyz, hlístice, myši, ale i primáti), ale již delší dobu se používá screening na modelech *in vitro*. I když *in vitro* způsobem nelze prověřovat všechny targety (např. působení na psychické nemoci), je to etičtější, rychlejší a levnější alternativa proti živým modelům. Rozšířeným způsobem prověřování targetů *in vitro* je technologie tkáňových mikrosouborů (tissue microarray – TMA)<sup>374</sup>. Jde spíše o makrosoubory lidských a jiných tkání. Jiným důležitým nástrojem prověřování targetů jsou proteinové mikrosoubory používané i pro identifikaci targetů<sup>375</sup>. Proteinové mikrosoubory usnadňují analýzu interakcí protein-protein, protein-ligand, nebo protein-lék, a proto hrají kritickou roli v mnoha oblastech molekulární medicíny.

#### 5.4.3.4. Zkušební systémy

Organizace zabývající se objevováním léků potřebují dnes pro vývoj úspěšného zkušebního systému vědecké pracovníky, kteří mají schopnosti kombinovat vědecké znalosti, účinné plánování a realizaci výsledků. V současné době se používá řada tradičních i nových zkušebních systémů, z nichž mnohé jsou nabízeny renomovanými firmami. Zkušební systémy lze rozdělit v zásadě do dvou oblastí: biochemické systémy a systémy založené na živých buňkách. Jde v podstatě o laboratorní systémy sestavené podle potřeb zákazníků pro provádění potřebných biochemických operací, případně pro práci s buňkami, při identifikaci a screeningu targetů (primární screening) a méně podrobný screening vybraných kandidátů na nové léky (sekundární screening).

#### 5.4.3.5. ADME-TOX

Aby se mohl stát nový kandidát na lék účinným lékem, musí být nejen aktivní ve vztahu k targetu, ale současně mít další vlastnosti, které se zkráceně vyjadřují zkratkou ADME-TOX (**A**dsorption, **D**istribution, **M**etabolism, **E**xcretion a **T**oxicity). Mnoho let se zkoušky těchto vlastností prováděly *in vivo*. Rostoucí počet targetů a kandidátů léků (leads) vyvolal nutnost vývoje nových výkonnějších metod zjišťování uvedených vlastností, zejména zkouškami *in*

---

<sup>373</sup> **Malé molekuly.** Látky tvořící buňky, mohou být rozděleny do tří tříd: anorganické ionty, **malé** organické molekuly a makromolekuly. Malé molekuly jsou např.: alifatické uhlovodíky, alkoholy, aldehydy a ketony, organické kyseliny, estery, monosacharidy, disacharidy, aromatické uhlohydráty, aminokyseliny, lipidy atd. Makromolekuly můžeme rozdělit na proteiny, polysacharidy a nukleové kyseliny. Malé molekuly jsou velmi významné při výzkumu funkce buněk na úrovni genomů. Většina léků, od aspirinu k antihistaminikům, jsou látky složené z malých molekul.

<sup>374</sup> [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com); [www.lsbio.com](http://www.lsbio.com)

<sup>375</sup> [www.biomax.us/proteinarrays.php](http://www.biomax.us/proteinarrays.php)



*vitro*. Vysoce výkonná a automatizovaná zařízení pro zkoušení ADME-TOX nových kandidátů léků nabízí dnes řada specializovaných firem.

#### 5.4.3.6. Optimalizace klíčových sloučenin

Posledním procesem před prováděním předklinických zkoušek je optimalizace vlastností vybraných klíčových sloučenin - kandidátů na nový lék (v anglosaské praxi „leads“). Je to komplexní proces upřesňování chemického složení pro zlepšení charakteristik léku s cílem jeho výroby pro předklinické zkoušky. V současné době mnoho výzkumníků používá při optimalizaci vlastností nového léku kombinace empirického, kombinatoriálního a racionálního přístupu. Problém přináší rozsáhlé využívání metod kombinatoriální chemie, což vede k formulaci látek z vyšší molekulovou hmotností a hydrofóbií. Zkoumají se především biofyzikální charakteristiky nového léku (rozpuštěnost ve vodě, strukturní stabilita při vyšších teplotách (50-55°C), odolnost proti mechanickému namáhání (protřepávání) atd.

#### 5.4.4. MOŽNOSTI APLIKACE MIKRO- A NANOTECHNOLOGIÍ

V dnešní době téměř všechny farmaceutické společnosti používají podobné technologické procesy při objevování nových léčiv. Tyto postupy zahrnují klonování a expresi lidských receptorů a enzymů v systémech, jež umožňují vysoce výkonný automatizovaný screening a rovněž dovolují využívat kombinatoriální chemii. Jak bylo uvedeno, abychom měli relativně vysokou pravděpodobnost, že najdeme nový lék, provádíme náhodný screening za pomoci dostatečně rozsáhlých a různorodých knihoven struktur. Významný rozvoj aplikace genetiky a genomiky s cílem pochopit spojení mezi nemocemi a genovými produkty je další hnací silou výzkumu nových léků. Současný postup klade důraz na objevování nových klíčových sloučenin - kandidátů léků, které mohou být využívány v různých aplikacích. Je skutečností, že pravděpodobnost, že se kandidát nového léku dostane na trh, zůstává prakticky nezměněna a činí přibližně 8 % z počtu navržených kandidátů. Stojí za povšimnutí, že doba od objevu nového léku až po jeho schválení pro trh se nesnižuje, jak by se dalo očekávat při existující vyšší automatizaci mnoha procesů. Zůstávají četné problémové oblasti jako například:

- Současné metody syntézy látek
- Skladování a možnost opětovného použití látek (je nedostatečné a neadekvátní)
- Zlepšení kvality informací při výběru targetů a jejich prověřování
- Včasnější získávání kvalitních údajů o ADMET v průběhu procesu vývoje léku
- Metody screeningu (je třeba výrazně zvýšit jeho výkonnost a snížit spotřebu reagens)
- Atd.

Je zřejmé, že mnoho významných řešení umožní aplikace mikrotechnologií a nanotechnologií. V případě nanotechnologií je to zejména proto, že rozměrová škála, ve které objevování a výzkum léčiv převážně probíhá, je víceméně stejná jako ta, kterou jsou definovány nanotechnologie - tj. od 100 nm dolů směrem k atomové úrovni (přibližně 0,2 nm). Jak je naznačeno na **obr. č. 79**, mají při vyhledávání a vyhodnocování targetů významnou roli chemogenomika, funkční genomika<sup>376</sup>, farmakogenomika a proteomika.

Farmakogenomika je vědní oblast zabývající se vlivem genetických variací na odezvu léků u pacientů porovnáváním genové exprese nebo polymorfizmu jednoho nukleotidu (SNP)

<sup>376</sup> Kramer R., Cohen D „Functional Genomics to New Drug Targets“, Nature Reviews Drug Discovery, 3, 2004, str. 965.

s účinností nebo toxicitou léku. Jejím cílem je vývoj racionálních prostředků pro optimalizaci léčby, s ohledem na pacientův genotyp. Spolu s proteomikou, která je součástí genomiky a zabývá se identifikací proteinů v těle a stanovení jejich úlohy v životních pochodech uvnitř těl organismů, tvoří dnes vědní základ farmakologie. Informace plynoucí s těchto vědních oborů nacházejí vzrůstající počet aplikací v mnoha oblastech, nejen při výzkumu nových léků, ale i při porozumění a léčení rakoviny, AIDS a dalších prozatím nesnadno léčitelných chorob.

Konvenční zařízení pro studium genomických a proteomických problémů jsou drahá a náročná na vysoce odbornou laboratorní práci. Proto je značná poptávka po rychlých a nenákladných analytických technikách. Nové technologie by měly pomoci zmenšit mezeru mezi velkými objemy genomických informací a jejich aplikací, např. v budoucí personifikované (osobní) medicíně. V současné době pozorujeme úsilivnou snahu vědců, výzkumníků a konstruktérů ve výzkumných pracovištích i specializovaných firmách o miniaturizaci biolékařských zařízení pro genomiku a proteomiku a mnoho typů přístrojů a technik patřících do kategorie mikrozařízení je již na trhu. Nedávný pokrok při vývoji zařízení pracujících v oboru nanometrů, intenzivní využívání nanomateriálů a výrobních nanotechnologií, je slibnou perspektivou pro brzkou implementaci při vývoji léků i v lékařské praxi.

Nanotechnologie nemohou poskytnout konečné řešení na všechny problémy. Je však stále jasnější, že mnohé z nástrojů, které byly vyvinuty v průběhu rozvoje nanotechnologií a nanovědy, již hrají a dále budou hrát při objevování léků důležitou roli.

Jde především o tyto oblasti<sup>377</sup>:

- Aplikace moderních zobrazovacích a analytických metod vyvinutých pro zkoumání v nanometrických rozměrech
- Zlepšení identifikace a prověřování targetů nových léků
- Snížení doby identifikace nových léků
- Snížení objemu drahých činidel při provádění screeningu potenciálních léků
- Zlepšení zviditelňování interakce léků s tkáněm

#### **5.4.4.1. Aplikace moderních zobrazovacích a analytických metod**

Přehled moderních zobrazovacích a analytických metod a přístrojů, používaných dnes při výzkumu i praxi v různých oblastech biotechnologie a medicíny, je uveden v kapitole 5.1. Mnoho z těchto metod nelze považovat za příspěvek nanotechnologie. Stále je základním zobrazovacím nástrojem konfokální fluorescenční mikroskop, který se stále vyvíjí a byla již prolomena difrakční bariéra (stimulovanou emisí – STED), nukleární magnetická rezonance (MRI), PET atd. I zde probíhá výzkum rozšířeného uplatnění těchto metod ve výzkumu nových léčiv, jako např. použití MRI<sup>378</sup>. Nicméně, zejména některé zobrazovací, analytické a manipulační metody, které stojí za rozvojem nanotechnologií, se již staly běžnými při výzkumu léků. Jsou to především zařízení pro sondovou mikroskopii (AFM, SICM), mikroskopie v blízkém optickém poli (SNOM), zařízení využívající povrchovou rezonanci plasmonů, optické pinzety atd.

---

<sup>377</sup> „New Report Says Nano-Enabled Drug Discovery Market to Reach \$ 1,3 Billion by 2009“, [www.nanomarket.net](http://www.nanomarket.net), 3/2005

<sup>378</sup> Beckmann N. „*In Vivo* Magnetic Resonance Techniques and Drug Discovery“, Brazilian Journal of Physics, 36, No. 1A, 2006, str. 16.

#### 5.4.4.2. Zlepšení identifikace a prověřování targetů nových léků

Rozhodující technikou, která umožní zlepšení identifikace a prověřování targetů nových léků je jejich vysokovýkonné prošetřování technikou mikro- a nanosouborů a vývoj nových biosenzorů. O možnostech těchto technik jsme se zmínili v podkapitole 5.1.6.5. a v kapitole 5.2. S aplikací nových metod se zvýší i jejich citlivost, a tím i spotřeba drahých činidel – viz např. podkapitola 5.2,4 o metodě Bio-bar Code Assay.

#### 5.4.4.3. Zlepšení zviditelňování interakce léků s tkáněmi

Očekává se, že významnou roli sehraje v budoucnosti kvantové tečky, které mají podstatně větší intenzitu fluorescence než tradiční fluorescenční barviva – viz podkapitola 5.3.1.2. Pro jejich bezpečnou aplikaci *in vivo* je zapotřebí provést řadu toxikologických výzkumů.

### 5.4.5. CÍLENÁ DOPRAVA LÉKŮ DO ORGANIZMU

Velmi pomalý pokrok v léčbě těžkých nemocí vedl vědce k přijetí postupu, který zahrnuje mnoho oborů a který znamená cílenou dodávku léku do organismu a jeho uvolňování. Nové systémy dodávky léku do organismu kombinují nauku o polymerech, farmakologii, chemii biokonjugátů a molekulární biologii. Cílem je zlepšit kontrolu nad farmakokinetikou a farmakodynamikou léků, nad jejich nespecifickou toxicitou, imunitními reakcemi, rozpoznáváním biologických systémů a zároveň zvýšit účinnost léků. Důležitost problému je zřejmá z **obr. č. 77**, kde je uvedena procentuální hodnota podílu systémů dopravy léků na celkovém objemu trhu s léčivými.

Obecně, doprava léků do organismu je proces, kdy léčivo je podáváno do těla kontrolovaným způsobem. Je to důležitá oblast, která při objevování nových léků nemůže být pominuta.

#### 5.4.5.1. Způsoby podávání léků

Výběr léku je často ovlivněn způsobem, jakým je lék podáván, jelikož zde může být rozdíl v tom, bude-li lék působit úspěšně nebo neúspěšně. Výběr způsobu podání léku může tedy být ovlivněn tím, zda jej pacient akceptuje, dále důležitými vlastnostmi léku (tj. jeho rozpustností), schopností dosáhnout cíle – místa nemoci nebo účinností léku v boji se specifickou chorobou.

Nejdůležitějším způsobem, kterým se lék podává, je **perorální** metoda. Stále větší množství léků je na bázi proteinů a peptidů. Často nabízejí velký potenciál pro účinnější terapeutika, ale nepřekonávají lehce slizniční povrchy a biologické membrány, dochází k jejich snadné deformaci nebo znehodnocení, mají sklon k rychlé degeneraci v játrech a v jiných tkáních těla a rovněž vyžadují přesné dávkování. V současné době jsou proteinové léky obvykle podávány injekcemi, ale tuto cestu pacienti akceptují méně a kromě toho to vyvolává problémy s koncentrací léku v krevním oběhu. Navzdory překážkám, které pro úspěšnou dodávku léku do organismu existují v gastrointestinálním traktu (hydrolyza v žaludku vyvolaná kyselinou, odbourávání léku enzymatickým působením v celém gastrointestinálním traktu, bakteriální kvašení v tlustém střevě), je tedy perorální způsob podávání léku stále intenzivně zkoumán, jelikož nabízí ty výhody, že je pohodlný a levný ve smyslu podávání léku i jeho výroby.

**Parentální cesty** podávání léku (tj. mimo zažívací trakt - intravenózně, intramuskulárně nebo podkožně) jsou velmi důležité. Na trhu jsou k dispozici pouze jediné systémy, které jsou podávány intravenózně, a to jsou liposomy. Nanometrické nosiče léků mají ohromný

potenciál pro zlepšení dodávky léků prostřednictvím nosních a sublingválních cest, přičemž při podání léku oběma způsoby se tak vyhneme prvním účinkům metabolismu, a jejich využití spočívá i tam, kde je obtížný přístup, tj. v očních, intraartikulárních a mozkových dutinách. Bylo možné dopravit peptidy a vakcíny při systematickém využívání nosních cest tím, že aktivní makromolekuly léku byly připojeny k nanočásticím. Kromě toho zde ještě existuje možnost, jak zlepšit dostupnost léků do očního okolí, jsou-li podávány v koloidním nosiči léků.

**Podávání léků přes plicní systém** je rovněž velmi důležité a je prováděno různými způsoby – prostřednictvím aerosolů, systémů inhalace, kdy je odměřena dávka léku, pomocí prášků (inhalátory suchých prášků) a roztoky (rozprašovače), které mohou obsahovat nanostruktury jako jsou liposomy, micely, nanočástice a dendrimery. Aerosolové produkty vyráběné pro dodávku léků dýchacími cestami tvoří více než 30% všech systémů dodávky léků do organismu na trhu. Výzkum v oblasti podávání léků skrze plíce je veden snahou využít toho, že tímto způsobem bude potenciálně úspěšná dodávka proteinových a peptidových léků do organismu. Tento mechanismus dodávky léku se jeví slibný a efektivní i v oblasti genové terapie (tj. v léčbě cystické fibrózy), a rovněž proto, že je potřeba nahradit freonové pohonné látky obsažené v inhalačních systémech s odměřovanými dávkami léků. Dodávka léku do organismu přes plicní systém umožňuje dopravit lék přímo do cílového místa v léčbě respiračních chorob a stále více se zdá, že to je realizovatelná volba, jak systematicky dodávat léky do organismu. Úspěšnost dodávání proteinových léků do organismu přes plicní systém je však nabourávána proteázami v plicích, které redukují jejich celkovou biologickou dostupnost a rovněž i bariérou mezi krví ve vlásečnicích a vzduchem v alveolách (bariéra krev – vzduch).

**Transdermální dodávkou léků do organismu** se můžeme vyhnout takovým problémům jako je podráždění v gastrointestinálním traktu, metabolickým potížím, odchylkám v rychlosti dodávky či poruchám při dodávce v důsledku přítomnosti potravy. Je rovněž vhodná pro pacienty v bezvědomí. Technika je obecně neinvazivní, je dobře pacienty přijímána a lze ji využívat k lokální dodávce léku po několik dní. Nedostatkem je nízká rychlost penetrace, dávkování není flexibilní a/nebo přesné a je omezeno na léky s nízkou koncentrací.

**Systémy dodávky léků přes tkáň a systémy lokální dodávky léků do organismu** patří mezi systémy, které musí být nutně pevně zafixovány k vyříznuté tkáni v průběhu chirurgického zákroku. Cílem je dosáhnout zvýšeného farmakologického efektu a minimalizovat systémovou toxicitu spojenou s podáváním léku. Systémy dodávky léku přes tkáň jsou tyto: želatinové gely s nákladem léků, které se vytvářejí *in situ* a přilnou k vyříznutým tkáním, přičemž se uvolní léky, proteiny nebo adenoviry se zakódovanými geny; želatinové gely se zafixovanou protilátkou (cytokinová bariéra – rozpustný faktor produkovaný buňkami), které vytvářejí bariéru, jež může na cílové tkáni zabránit tomu, aby tuto tkáň cytokiny prostoupily; dodávka léků na buněčné bázi, která obsahuje geneticky změněný orální mukózní epiteliální povlak implantovaný do buňky; dodávka léků do organismu řízená přístrojem – zařízením pro infuzi léků, které lze znovu léky naplnit a jež může být připojeno k vyříznutému místu.

**Dodávka genů do organismu** je náročný úkol v léčbě genetických poruch. Do cílových buněk musí být zaveden plazmid DNA. Následně je potřeba jej přepsat a genetická informace musí být nakonec přenesena do odpovídajícího proteinu. Abychom toho dosáhli, je třeba překonat mnoho překážek. Systém dodávky genů do organismu musí být zaměřen na cílovou buňku, přepraven přes buněčnou membránu, pak musí být zachycen a odbourán v endolysosomech a plazmid DNA přepraven nitrobuněčnou cestou do jádra.

Všechny výše uvedené metody mají své výhody i nevýhody. Bohužel, vedlejší efekty jsou v řadě případů velké, zejména v případech, kdy léky jsou určeny k zabíjení buněk (léčení rakoviny). V poslední době je problémem i doprava ve vodě nerozpustných léků na určené místo. Pilulky a injekce slouží velmi dobře, ale pacienti s chronickými nemocemi, jako jsou cukrovka nebo srdeční onemocnění, nejsou příliš spokojeni. Probíhá proto intenzivní výzkum dalších způsobů dopravy léků. Moderní technologie poskytují nová, prakticky použitelná řešení optimalizace dopravy farmaceutických výrobků na místo určení v těle. Léky je zapotřebí během jejich dopravy na cílové místo chránit, aby se zachovaly jejich chemické a biologické vlastnosti, potřebné pro účinnou léčbu. Některé léky jsou totiž toxické a mohou způsobit nežádoucí vedlejší účinky a omezit léčebný účinek, jsou-li během dopravy rozloženy. Dopravní doba a šance úspěšné dopravy léku se velmi liší v závislosti na tom, kde jsou léky absorbovány (např. v tračniku<sup>379</sup> nebo v tenkém střevě apod.), případně zda je nutné překonat určité přírodní obranné mechanismy (např. hemoencefalickou bariéru<sup>380</sup>).

Jakmile dosáhne lék místo svého určení, je zapotřebí, aby byl pro jeho optimální účinnost uvolněn určitou rychlostí. Uvolní-li se lék příliš rychle, může být zcela absorbován nebo může způsobit zažívací potíže, či mít jiné vedlejší účinky. Systém dopravy léku musí pozitivně působit na rychlost absorpce léku, jeho distribuci, metabolismus a vyloučení. Systém dopravy léku musí dále umožnit, aby byl lék připojen k cílovému receptoru (targetu) a ovlivnit jeho činnost a signalizaci.

Systém dopravy léků má významná omezení co se týká použitých materiálů a technologie výroby. Materiály musí být biokompatibilní a musí se snadno vázat na lék. Musí být po použití schopné degradovat na fragmenty, které jsou pak buď metabolizovány nebo eliminovány normálními vylučovacími cestami. Výrobní technologie musí být nákladově příznivá.

Mikro- a nanotechnologie nabízejí nová řešení dopravy léků. Jsou to:

- Různé druhy nanostrukturních materiálů, které je možné použít při dodávce léků do organismu jako jejich nosiče (nanoprášky, nanopouzdra, fullerény, nanotrubice, dendrimery, kvantové tečky a nanoporézní materiály)
- Mikro- a nanosystémy (pumpy a ventily, MEMS a NEMS zařízení, soubory mikro- a nano jehel )

#### 5.4.5.2. Nové systémy cílené dopravy léků do organismu – přínos nanotechnologií

Systémy dopravy léků mají značný dopad na lékařské terapeutické technologie, velmi zlepšily účinnost mnoha existujících léků a umožnily použití zcela nových léčebných postupů. Úsilí o miniaturizaci zařízení pro dopravu léků z makro rozměrů (> 1 mm) k mikro rozměrům (100 – 0,1 μm) k nano rozměrům (100 – 1 nm) nabídlo integrované systémy, které kombinují technická zařízení s terapeutickými molekulami (malé molekuly, nukleové kyseliny, peptidy a proteiny) a umožnilo vytváření implantovatelných zařízení, které mohou monitorovat zdravotní stav a poskytnout profylaktické nebo terapeutické působení *in situ*<sup>381</sup>.

Motivací pro zmenšování rozměrů systémů pro dopravu léků je:

- co nejmenší zásah do těla
- cílená terapie specifických druhů tkání

<sup>379</sup> Tračník – největší část tlustého střeva

<sup>380</sup> Hemoencefalická bariéra brání kontaktu mozku s některými nežádoucími látkami. Mozek a mícha jsou odděleny od krevního řečiště kompartmentem, který představuje mozkomíšni mok (likvor).

<sup>381</sup> La Van L.A. et al „Small – scale Systems for *in vivo* Drug Delivery“, Nature Biotechnology, 21, 2003, str. 1184.

- zvýšení účinnosti léků
- snížení dávky a vedlejších účinků

Nové systémy cílené dodávky léku do organismu mají za cíl minimalizovat znehodnocení léku a jeho ztrátu, zabránit jeho škodlivým vedlejším účinkům a zvýšit dostupnost léku v místě výskytu nemoci. Jako nosiče léku slouží mikro a nanočástice, mikro a nanokapsle, lipoproteiny, liposomy a micely, které mohou být zkonstruovány tak, aby se odbourávaly pomalu, reagovaly na podněty a měly specifický účinek v místě působení. Mechanismy zacílení mohou být buď pasivní nebo aktivní. Příkladem pasivního zacílení je přednostní akumulace chemoterapeutik v tumorech tuhé konzistence, která je důsledkem krevního zásobení nádorové tkáně ve srovnání s tkání zdravou. Aktivní zacílení spočívá v chemickém „dekorování“ povrchu nosičů léku molekulami, což umožňuje, aby byly selektivně připojovány k nemocným buňkám.

Řízené uvolňování léků je rovněž důležité pro úspěch v léčbě. Toto uvolňování léků může být trvalé nebo periodické. Způsoby plynulého uvolňování léků zahrnují např. polymery, které uvolňují lék ven z polymeru řízeným způsobem pomocí difúze nebo odbouráváním polymeru v průběhu doby. Často je upřednostňováno periodické uvolňování léku, jelikož jde o napodobení způsobu, kterým tělo přirozeně vyrábí hormony jako například inzulin. Toho lze dosáhnout pomocí polymerů nesoucích lék, které reagují na specifické podněty (například na působení světla, na změny pH nebo teploty).

Jiné metody týkající se dodávky léku do organismu, které jsou založené na nanotechnologii, se zaměřují na překonání určité fyzikální bariéry jakou je například hemoencefalická bariéra; nebo si kladou za cíl nalézt alternativní a přijatelné cesty, jak doručit novou generaci léků na bázi proteinů jiným způsobem než přes gastrointestinální trakt, kde může dojít k znehodnocení léků. Nanověda a nanotechnologie začínají představovat základnu pro inovační techniky dodávky léků do organismu, které mohou být velkým přínosem pro pacienty a zároveň mohou vytvořit nový trh pro farmaceutické firmy a společnosti zabývající se dodávkou léků do organismu.

Je však logické, že zařízení nemůže být příliš malé, aby bylo schopné zajistit dodávku léků, které vyžadují dávkování v mikrolitrech a větších objemech. Dnešní dávka je typicky v desítkách až stovkách  $\mu\text{g}$ . Snižování rozměrů totiž rychle snižuje objem, který je k dispozici. Zařízení, které obsahuje zásobník o krychli se stranou 1 mm, obsahuje objem  $1\ \mu\text{l}$ ,  $100\ \mu\text{m}^3$  obsahuje 1 nl a  $10\ \mu\text{m}^3$  obsahuje 1 pl. Do určité míry může být malá kapacita malorozměrných systémů dodávky léků zvětšena jejich použitím ve vazbě na větší nádoby (v rozsahu ml nebo mm) nebo použitím souboru těchto zařízení.

Je třeba poznamenat, že klasické rozdělení rozměrové škály na makro-, mikro- a nanorozměry není v případě popisu a porovnávání metod dodávky léků příliš vhodné, spíše se dá hovořit o malorozměrových systémech.

#### 5.4.5.2.1. Nosiče léků

Úspěšný systém nosiče léků musí mít schopnost dopravovat optimální množství léku a umožnit jeho uvolňování, musí mít dlouhodobou skladovatelnost a nízkou toxicitu. Koloidní systémy jako jsou například roztoky micel, disperze vezikul a tekutých krystalů a rovněž i disperze nanočástic, které mají průměr v rozmezí 10 – 400 nm, se zdají být velkou nadějí jako nosiče v systémech dodávky léků do organismu. Mezi hlavní kandidáty lze počítat následující materiály:

**Micely:** Léky mohou být zachyceny v jádru micely a přepraveny v ještě větších koncentracích než je jejich skutečná rozpustnost ve vodě. Kolem micely může vzniknout

hydrofilní plášť, který účinně chrání její obsah. Kromě toho může vnější chemie pláště bránit rozpoznání micely retikuloendoteliálním systémem, a tím i zabránit jejímu předčasnému odstranění z krevního řečiště. Další vlastnost, která činí micely atraktivními, je to, že lze změnit jejich velikost a tvar. Chemické techniky využívající síťování molekul mohou zlepšit stabilitu micel. Micely lze rovněž chemicky změnit tak, aby selektivně vyhledávaly targety mnoha nemocí.

**Liposomy:** Jak již bylo uvedeno, liposomy jsou malé fosfolipidové dvouvrstvé váčky (vezikuly). Jejich základními molekulami jsou amfifilické fosfolipidní molekuly, které spontánně tvoří liposomy ve vodním prostředí. Hydrofilní konce globulárních dvojvrstev míří k vodní straně, hydrofobické konce jsou oboustranně orientovány do středu vrstvy. Liposomy mohou být tvořeny jednou (průměr ~ 20-50 nm) nebo dvěma (průměr až do 10 μm) lamelami. Problémem je, že konvenční liposomy jsou rychle v organizmu likvidovány fagocyty. Mají i nízkou stálost při skladování. Cestou pro odstranění těchto problémů je pohlávkání liposomů.

Firma ALZA vyvinula liposomovou technologii STEALTH<sup>®</sup> pro intravenózní aplikaci, např. léků proti rakovině<sup>382</sup>. Technologie používá povlak liposomu polyetylen glykolem (PEG)...

**Dendrimery** (5.3.5) jsou polymerní nanometrické makromolekuly. Sestávají z centrálního jádra, rozvětvených jednotek a terminálních funkčních skupin. Vlastnosti rozpouštění v dutině uvnitř jádra určuje chemie jádra, zatímco vnější chemické skupiny určují rozpustnost a chemické reakce samotného dendrimera. Dendrimer je nasměrován na nemocné místo připojením specifických linkerů (spojníků) k vnějšímu povrchu dendrimera, což mu umožňuje se navázat na nemocné místo, zatímco pomocí povlečení dendrimerů PEG řetězcem lze dosáhnout jejich stability a ochrany před fagocyty.

**Tekuté krystaly** kombinují v sobě vlastnosti jak kapalné, tak i pevné fáze. Tekuté krystaly lze vyrobit tak, aby vytvářely různé konfigurace a měly střídající se polární a nepolární vrstvy (tj. lamelární fáze), uvnitř nichž mohou být zakomponovány vodní roztoky léků.

**Nanočástice**, včetně nanokoulí a nanopouzder – **obr. č. 81**, mohou být amorfní nebo krystalické. Jsou schopny absorbovat a/nebo opouzdřit lék, a tím jej ochránit před chemickým a enzymatickým znehodnocením. V nanopouzdrech je lék uzavřen v dutině obklopené polymerní membránou, zatímco nanokoule sestávají z pevné matrice, v které je lék fyzikálně rovnoměrně rozptýlen.

Z anorganických materiálů se uplatnily **nanočástice zlata** (5.3.1.1.), ke kterým se účinné látky a cílové molekuly mohou připojit prostřednictvím thiolové vazby<sup>383</sup>. Nanočástice zlata mohou být i součástí mikropouzder vhodných pro dopravu léků. Mikropouzdra s opticky adresovatelným obalem sestávajícím z polyelektrolytu a zlatých nanočástic byla vyvinuta na University of Melbourne, Department of Chemical Technology and Biomolecular Engineering, Centre for Nanoscience and Nanotechnology<sup>384</sup>. Mnohvrstvá polymerová obálka byla infiltrována nanočásticemi zlata o průměru 6 nm, která reagovala na krátkodobé ozáření infračerveným pulsem laseru (10 ns). Nanočástice absorbují světlo a přemění je v teplo, které rozruší mikropouzdro a uvolní obsah. Ozářením při vhodné vlnové délce se mohou zahřát i částice v hlubších vrstvách kůže.

Jako nosiče léků se uplatnily i **nanočástice SiO<sub>2</sub>** (5.3.1.3.)<sup>385</sup>.

<sup>382</sup> [www.alza.com/alza/stealth](http://www.alza.com/alza/stealth)

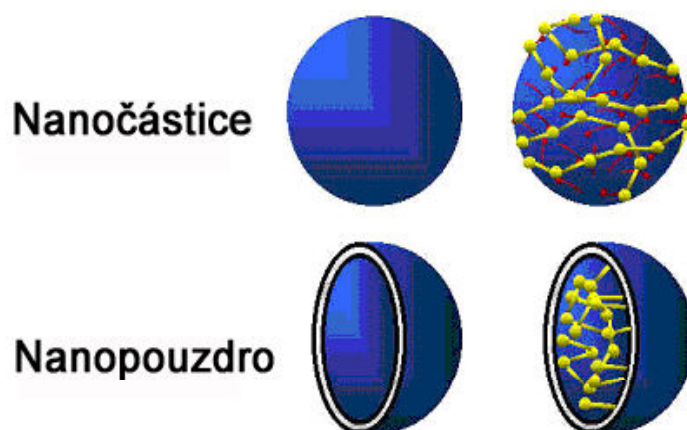
<sup>383</sup> Goodsell D.S.: „Bionanotechnology“, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2004, str. 24, ISBN 0-471-41719-X

<sup>384</sup> Lewis S.: „Gold Nanoparticle-shelled Polymer Capsules Show Drug Delivery Potential“, NanoBiotech News, 3, No. 9, 3/2005

<sup>385</sup> [www.nanomat.com](http://www.nanomat.com)

Pro dopravu léků se rovněž používají různé přírodní nebo biokompatibilní syntetické polymery jako jsou: polysacharidy, polymléčná kyselina (poly lactic acid - PLA), polylaktidy, polyakryláty, polyalkylcyanoakryláty, polyalkylvinylpyrolidony nebo akrylové polymery. Jsou-li **polymerní nanočástice** vstříknuty do žil, jsou obvykle během krátké doby absorbovány fagocyty. Tento efekt má za následek, že použití polymerních částic v dodávce léků do organismu je omezené v případě, že chceme cíleně akumulovat lék v určitém orgánu. V současnosti se zkoumá, jak předejít fagocytóze tím, že budou částice povlečeny speciálními molekulami. Polymerní nanočástice jsou obvykle ve tvaru koulí. Problémy: deficit vhodných výrobních procesů, které by byly vzhledem k vynaloženým nákladům efektivní, cytotoxicita Výzkum: optimalizace povrchu polymerních nanočástic s cílem zvýšit období retence, vývoj polymerních nanočástic pro hydrofilní sloučeniny (peptidy, proteiny, oligonukleotidy), vývoj polymerních nanočástic pro orální použití.

Dodávku nanočástic hluboko do plicních tkání, kde jsou rychle absorbovány, je možné provádět prostřednictvím **aerosolů**. Např. modifikované polystyrenové nanočástice (25 nm, 170 nm, 1000 nm) byly pro dopravu aerosolem umístěny do porézních nosných částic o rozměru cca 5  $\mu\text{m}$  a hmotnosti 0,1  $\text{g}/\text{m}^3$  a méně, čímž se zkombinovala snadnost dopravy pomocí aerosolu s bioaktivitou nanočástic, které se uvolnily ze své „schránky“ hluboko v plicní tkáni. Nanočástice mohou být z různých materiálů. Ukázalo se, že vyvinutý systém je robustní a může mít mnohostranné využití<sup>386</sup>.



*Obr. č. 81 Nanočástice a nanopouzdro*

**Nanoporézní materiály** mají otvory menší než 100 nm a lze je charakterizovat jako velmi houbovitě látky s nepatrnými póry. Nanoporézní materiály se vyrábějí z rozličných materiálů jako např. z uhlíku, křemíku, různých polymerů, keramiky a dalších sloučenin. Zajímavým materiálem je POSS (polyedrický oligomerní silsesquioxan). Nanoporézní materiály jsou použitelné pro dopravu léků na žádané místo proto, že umožňují obejít tělesný imunitní systém. Klinické zkoušky probíhají např. s nanoporézními  $\text{SiO}_2$  a fosforečnanem vápenatým pro dopravu insulinu inhalací.

**Molekulárně tištěné polymery** mají ohromný potenciál v oblasti dodávek léků do organismu. Jako příklad mohou sloužit: dodávky léku do organismu s naprogramovanou rychlostí, kde se lék ze systému šíří podle specifického rychlostního diagramu; dodávka léku do organismu s regulovanou aktivací, kde je uvolňování léku aktivováno prostřednictvím určitých fyzikálních, chemických nebo biochemických procesů; dodávka léku do organismu

<sup>386</sup> Tsapis N. et al „Trojan Particles: Large Porous Carriers of Nanoparticles for Drug Delivery“, PNAS, 99, 2002, str. 12001.



regulovaná zpětnou vazbou, kde rychlost uvolňování léku je regulována prostřednictvím koncentrace spouštěcího agens, který je aktivován koncentrací léku v těle.

Na rozdíl od většiny uvedených aplikací, je aplikace metody molekulárního otisku v raném stádiu vývoje. Lze očekávat, že v příštích několika letech dojde k významnému pokroku, přičemž se bude využívat i vývoje technologií z jiných oblastí.

#### 5.4.5.2.2. Mikro- a nanosystémy

**Kapalně preparáty** vytvářející (polo) tuhé depotní (zásobovací) místo poté, co byly podkožně vstříknuty, představují z hlediska mimostřevních (ne úst) aplikací atraktivní systémy dodávky léku do organismu. Jsou méně invazivní a méně bolestivé ve srovnání s implantáty. Umožňují, aby byly léky dodávány lokálně nebo systematicky po dlouhou dobu, obvykle je to několik měsíců.. Tyto depotní systémy mohou minimalizovat vedlejší účinky tím, že jsou schopny stále působit podobně jako infuze, což je obzvláště důležité u dodávek proteinů s úzkým léčebným zaměřením. Mají rovněž tu výhodu, že je lze relativně levně a jednoduše vyrobit.

**MEMS (NEMS).** Důležitým cílem při řízeném uvolňování léku v organismu je vývoj mikro-(nano)metricky vyrobeného implantovatelného zařízení, které má schopnost na pokyn skladovat a uvolňovat potřebné množství léků. Poslední pokrok v mikroelektromechanických systémech (MEMS) umožnil, že byly vyrobeny mikročipy s řízeným uvolňováním látek, jež mají následující výhody:

- může být uskladněno nebo uvolňováno mnoho druhů chemikálií v jakékoliv formě (tj. v pevném či kapalném skupenství nebo ve formě gelu);
- spouštěčem pro chemické uvolňování látek je rozpad bariérové membrány, který nastane tím, že je aplikován elektrický potenciál;
- mnoho vysoce účinných léků může být potenciálně doručeno přesně a bezpečně;
- je možná i lokální dodávka léku, přičemž nastává vysoká koncentrace léku tam, kde je jej potřeba, zatímco systémová koncentrace léku zůstává na nízké úrovni;
- zavedením bariérové membrány se vyhneme průniku vody do zásobníku, čímž se zvýší stabilita léků na bázi konjugovaných proteinů, které mají omezenou životnost obálky.
- zařízení se vyvíjejí pro uvolňování různých dávek léků, a to jak pro okamžitou tak dlouhodobou dodávku (rok). Některé mohou být doplňovány lékem během provozu.

**Syntéza žádané molekuly *in vivo* na objednávku** je novým přístupem k dodávce léků. Zařízení pro tento způsob dodávky léků umožňuje syntézu terapeutik (např. peptidů nebo proteinů) s velkou pružností, např. molekuly mohou být syntetizovány kdy je třeba, buď mikro chemickém syntetizátoru nebo v programovatelné „zachycené“ buňce s vhodnou DNA. Tato zařízení využívají pokroků v **mikrofluidice**<sup>387</sup>. Aplikace těchto zařízení se očekává v nedaleké budoucnosti.

**Inteligentní systémy** umožňují řízení dávkování léku v reálném čase v závislosti na změnách chemické a fyziologické situace. V zásadě se pro dodávku léku k cílové tkáni používají dva hlavní přístupy: a) aktivace molekulárních interakcí světlem, RF (radiofrekvenční) a ultrazvukovou energií; b) systémy s materiály, u nichž kinetika uvolňování léků může být měněna externími stimuly.

<sup>387</sup> Saltzman W.M., Olbricht W.L. „Building Drug Delivery into Tissue Engineering“, Nature Reviews Drug Discovery, 1, 2002, str. 177.

Hansen C.L. et al „A Robust and Scalable Mikrofluidic Metering Method that Allows Protein Crystal Growth by Free Interface Diffusion“, PNAS, 99, 2002, str. 16531.

Aktivace molekulárních interakcí. Již před 25 lety začalo studium možnosti lokálního ohřevu nádorů zprostředkovaného RF nebo ultrazvukem (hypertermie)<sup>296</sup>. V poslední době se výzkum zaměřuje na miniaturní feromagnetické a superparamagnetické částice, které se vstříkují do nádoru a umožňují ohřev tkáně s minimálními potížemi pacienta.

Inteligentní povrchy a materiály. Řízené uvolňování léků z degradujících polymerů je dobře známé a v současné době se vyvíjejí nové druhy materiálů, včetně těch, u kterých je možné měnit rychlost uvolňování *in vivo*. U posledně zmíněných materiálů to naznačuje možnost vývoje zařízení s programovatelnou změnou kinetiky uvolňování léků externími stimuly. Jedním z těchto materiálů jsou **hydrogely**, polymery, které vytvářejí trojrozměrné hydrofilní sítě, do kterých je možné vložit potřebné látky. Hydrogely, jsou-li exponovány ve vodě, bobtnají, ale nerozpouštějí se. Jejich schopnost absorbovat a uvolňovat léky je možné řídit modifikací jejich molekulární konstrukce. Byly vyvinuty různé druhy hydrogelů, včetně těch, které jsou citlivé na specifické protilátky, které se rozpouštějí při přiložení náboje nebo u nichž se vzniklé nabobtnání po přiložení elektrického náboje opět reverzně zmenšuje. Každá z uvedených vlastností naznačuje cesty k regulování rychlosti uvolňování léků z matrice hydrogelu nebo ze zásobníku či kanálů pokrytého hydrogelem.

Dále se nabízí možnost využití **nanostrukturovaných inteligentních povrchů**. Jsou to především elektricky říditelné povrchy, které poskytují přímou metodu pro změnu (přepínání) rychlostí uvolňování léků. Poměrně nedávno byla popsána metoda používající samosestavenou monovrstvu o tloušťce 1 nm k změnám své molekulární konformace s nábojem. Výsledkem byly reverzní změny z hydrofóbního stavu na hydrofilní v důsledku malých změn v náboji<sup>388</sup>.

Další možností pro řízenou dodávku léků je její **spojení s implantovanými biosenzory a jinými implantáty** (kardiostimulátory, stenty). V současnosti je největším problémem v této oblasti vývoj plně biokompatibilních (**Tab.č.VI.**) a stabilně se zpětnou vazbou pracujících senzorů. Mnoho dřívějších pokusů se zaměřilo na systémy integrující dodávku léku a indikaci obsahu cukru v krvi při léčbě cukrovky. Zatím není na trhu žádný plně automatický dlouhodobě vyhovující *in vivo* systém<sup>389</sup>. Systémy selhávají především z důvodu výskytu usazenin z reakcí tkáně (záněty, zmnožení vaziva).

Mnoho výzkumných prací se zaměřuje na bezdrátový přenos energie k implantovaným senzorům, což by umožnilo zmenšit jejich rozměry a prodloužit jejich životnost. Pro aplikace při měření intraokulárního, intrakraniálního a arteriálního tlaku byla vyvinuta řada bezdrátových či pasivních senzorů využívající RF přenos energie. Pro přenos energie byl využit i ultrazvuk, který může proniknout hlouběji do tkáně než RF signál. Jiným pokusem o generaci energie *in vivo* byl vývoj palivového článku poháněného glukózou<sup>326</sup>. Vývoj neustále probíhá.

Každoročně se do lidských těl implantuje milióny implantátů, které mohou potenciálně sloužit jako zařízení pro místní dodávku léků. Jednou z již používaných metod jsou léky povlečené stenty. Léky slouží k potlačení rizika restenózy<sup>390</sup>.

Závěrem k této části lze konstatovat, že ideální systém pro *in vivo* dodávku léků by měl být schopen stanovit kde a jestli je dávka léku zapotřebí a pak zajistit tuto dodávku automaticky a po potřebnou dobu. K splnění tohoto cíle bude zřejmě zapotřebí ještě mnoho let vědecké a výzkumné práce.

<sup>388</sup> Lahann J. et al „A Reversibility Switching Surface“, Science, 299, 2003, str. 371.

<sup>389</sup> Kerner W. „Implantable Glucose Sensors: Present Status and Future Development“, Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 109, 2001, str. S341.

<sup>390</sup> Sonoda S. et al „Taxol-based Eluting Stents from Theory to Human Validation: Clinical and Intravascular Ultrasound Observations, J. Invasive Cardiol., 15. 2003, str. 109.

**Tab. č. VI. Biokompatibilita - definice<sup>391</sup>**

**Biokompatibilita dlouhodobě implantovaných zařízení** je schopnost zařízení poskytovat zamýšlenou funkci s požadovaným stupněm spojení s hostitelem, bez vyvolání nežádoucích místních nebo systémových jevů v hostiteli.

**Biokompatibilita krátkodobě implantovaných zařízení.** Biokompatibilita medicínských zařízení, která jsou úmyslně umístěna do kardiovaskulárního systému za účelem krátkodobé diagnostiky nebo z terapeutických důvodů, je schopnost zařízení provádět zamýšlenou funkci v proudu krve, s minimální interakcemi zařízení s krví, které by nepříznivě ovlivnily činnost zařízení. Činnost zařízení nesmí rovněž indukovat nekontrolovanou aktivaci buněčných proteinů a proteinů v plasmatické membráně vedoucích ke kaskádovitému srážení krve.

**Biokompatibilita produktů tkáňového inženýrství.** Biokompatibilita skeletu nebo matrix pro výrobky tkáňového inženýrství je schopnost působit jako substrát, který podporuje určitou buněčnou aktivitu zahrnující činnost molekulárního nebo mechanického signálního systému, za účelem optimalizovat regeneraci tkáně bez vyvolání jakékoliv nežádoucí místní nebo systémové odezvy v případném hostiteli.

---

<sup>391</sup> <http://en.wikipedia.org/wiki/Biocompatibility>

## 5.5. NANOMEDICÍNA

V úvodu kapitoly 5. jsme uvedli definici nanomedicíny předloženou ESF: **nanomedicína** je soubor věd a technologií využívaných pro diagnózu, terapii a prevenci chorob a traumatických poranění, utišení bolestí a pro ochranu a zlepšení lidského zdraví, které používají molekulární nástroje a znalosti o lidském těle na molekulární úrovni.

V poslední době byly zpracovány různé přehledové materiály zaměřené na nanomedicínu svědčící o velkém zájmu o tuto interdisciplinární a komplikovanou oblast<sup>392</sup>. Z obsahů těchto dokumentů vyplývají značné rozdíly v pojetí nanomedicíny jako vědní i aplikační disciplíny.

### 5.5.1. PŘEHLED OBLASTÍ NANOMEDICÍNY

Z citovaných publikací<sup>392</sup> vyplývá, že nanotechnologie mohou ovlivnit zejména následující oblasti medicíny:

- výzkum léků
- doprava léků do organismu
- metody zobrazování a diagnostiky
- terapie
- chirurgické techniky
- tkáňové inženýrství
- implantáty, včetně aktivních

Uvedené oblasti se částečně překrývají, záleží na úhlu pohledu. Někteří autoři zahrnují do oblasti medicíny také kosmetiku, potraviny a textilní a obalové materiály.

V předcházející podkapitolách 5.4.1. a 5.4.5. jsme charakterizovali současný postup při vývoji nových léků a způsoby jejich dopravy do organismu, včetně možného uplatnění nanotechnologií.

V navazující kapitole bude z výše uvedených oblastí medicíny pojednáno o metodách zobrazování a diagnostice, tkáňovém inženýrství a o možném přínosu nanotechnologie k terapii rakoviny.

### 5.5.2. ZOBRAZOVACÍ A DIAGNOSTICKÉ METODY A ZAŘÍZENÍ

Zobrazovací metody v lékařství se staly v průběhu posledních 25 let zásadním diagnostickým nástrojem. Molekulární zobrazování a léčba řízená pomocí snímání se nyní staly hlavním nástrojem pro sledování onemocnění a pro výzkum téměř všech aplikací léků

---

<sup>392</sup> Gordon N., Sagman U. „Nanomedicine Taxonomy“, vyd. Canadian NanoBusiness Alliance, 2/2003  
„Nanotechnology and its Implications for the Health of the EU Citizen“, The Nanoforum Report, vyd. M.Morrison, 12/2003, [www.nanoforum.org](http://www.nanoforum.org).  
Freitas R.A. „What Is Nanomedicine“: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 1, 2005, No. 1, str. 2  
„ESF Scientific Look on Nanomedicine“, 2/2005, European Science Foundation Policy Briefing No. 23, [www.esf.org](http://www.esf.org)  
„Roadmap Reports: Health and Medical Systems“, Nanoroadmap Project (FP6), vyd. VDI/VDE/IT, 11/2005.  
Roszek B., de Jong W.H., Geertsma R.E. „Nanotechnology in Medical Applications: State-of-art in Materials and Devices“, RIVM Report 265001001/2005, Nizozemí, 2005, [www.rivm.nl](http://www.rivm.nl).  
Jain K.K. „Nanotechnologies – Applications, Markets and Companies“, 6/2006, vyd. Jain Pharma Biotech, [www.pharmabiotech.ch](http://www.pharmabiotech.ch)

*in vivo*.. Původně byly zobrazovací techniky schopny odhalit pouze změny ve vzhledu tkání, a to tehdy, byly-li symptomy již relativně rozvinuté. Později byly zavedeny kontrastní látky, pomocí kterých mělo být snadnější nemoc identifikovat a zmapovat místo jejího výskytu. Lékařskou diagnostiku lze rozdělit do dvou oblastí, a to na aplikace *in vitro* (biosenzory a integrovaná zařízení) a na aplikace *in vivo* (implantovatelná zařízení, zobrazovací metody v diagnostice).

Diagnostika *in vitro* používaná v lékařství tradičně představuje mravenčí práci. Krev a další tělesné tekutiny nebo vzorky tkáně jsou odeslány do laboratoře k analýze, která může trvat hodiny, dny nebo týdny, v závislosti na použité technice a je velmi pracná. Mezi další z mnoha nevýhod patří postupné zhoršování jakosti vzorku, relativně vysoké náklady, dlouhá čekací doba (dokonce i u urgentních případů), nepřesné výsledky u malých množství vzorků, potíže při integraci parametrů získaných různými dalšími metodami a špatná typizace nashromážděných vzorků. Neustálá miniaturizace, paralelizace a integrace různých funkcí v jediném zařízení, které vycházejí z technik odvozených z průmyslu elektroniky, však vedly k rozvoji nové generace přístrojů a metod, které jsou menší, rychlejší a levnější, nevyžadují žádné zvláštní dovednosti a dávají nám přesné výsledky. Tyto přístroje potřebují ke své analýze mnohem menší vzorky a dodají nám mnohem úplnější a přesnější biologické údaje z jediného měření.

Diagnostika *in vivo* spočívá především ve využívání technik a metod popsanych v části 5.1.4., tedy ve využití metod rentgenové diagnostiky (CT), nukleárního zobrazování (PET), zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) a technik optického zobrazování.

Výzkum a vývoj diagnostických a zobrazovacích metod se rozvíjí jednak směrem k větší miniaturizaci odebíraných vzorků tkání a tělních tekutin, jednak směrem k rostoucí rozlišitelnosti biologických objektů, a to až na úroveň jedné molekuly. K tomuto trendu přispívá konvergence nanotechnologií a lékařských zobrazovacích a diagnostických metod.

### **5.5.2.1. Diagnostika *in vitro***

Nástrojem pro diagnostiku *in vitro* může být jediný biosenzor nebo integrované zařízení, které obsahuje mnoho biosenzorů. Biosenzor je vlastně senzor, jenž obsahuje biologický prvek jako je například enzym, který je schopen rozpoznat a signalizovat prostřednictvím určité biochemické změny, přítomnost, aktivitu nebo koncentraci specifické biologické molekuly v roztoku. Pro přeměnu biochemického signálu na měřitelný signál se používá převodník. Klíčovými vlastnostmi biosenzorů jsou jejich specifita a citlivost. Nástroje pro nanometrickou analýzu, jako jsou například skenovací sondová mikroskopie nebo zobrazovací hmotnostní spektrometrie, nabízejí nové možnosti v diagnostice *in vitro*, např. v molekulární patologii.

Miniaturizaci biosenzorů umožňují především techniky převzaté z elektronického průmyslu. Výsledkem miniaturizace je odběr menších vzorků a vývoj vysoce integrovaných řad senzorů, které paralelně provádějí různá měření z jediného vzorku. Vyšší specifita snižuje invazivnost diagnostických nástrojů a zároveň zvyšuje významně jejich efektivitu ve smyslu poskytování biologických informací, např. o fenotypech, genotypech nebo proteomech. Některé složité kroky v přípravě a analýze byly zakomponovány do jednoho zařízení, a tak vznikly prvé prototypy „laboratoře na čipu“, které mohou směřovat, zpracovávat a separovat kapaliny a provádět analýzu vzorku a identifikaci. Integrovaná zařízení mohou měřit desítky až tisíce signálů z jednoho vzorku, čímž mohou obvodnímu lékaři nebo chirurgovi poskytnout více doplňujících údajů z pacientova vzorku. Některá nanobiozařízení pro diagnostiku byla vyvinuta k analýze částí genomu nebo proteomu s použitím fragmentů DNA nebo protilátek jako sond (genové nebo proteinové mikro- nebo nano soubory či čipy).

Integrovaná zařízení lze využít ke včasné diagnostice nemoci a ke sledování pokroku v léčbě. Nový pokrok v technologiích v mikrofluidice se zdá být slibný a směřuje k realizaci plně integrovaného zařízení, které přímo dodává všechny údaje pro lékařskou diagnostiku z jednoho vzorku. Poslední vývoj se zaměřuje na rozvíjení diagnostických nástrojů *in vitro*, které by měly být využity ve standardním lékařském prostředí nebo například v léčebných přístrojích (point-of-care devices).

Konečným cílem diagnostiky *in vitro* je rychle, spolehlivě, specificky a nenákladně odhalit několika molekul (nebo dokonce i jedinou molekulu) v komplexním, neamplifikovaném a neoznačeném biologickém vzorku.

Aby bylo možné dosáhnout tohoto cíle, je třeba zkvalitnit diagnostiku *in vitro*, což vyžaduje<sup>393</sup>:

- nanoanalytické přístroje, které mají co nejvyšší prostorové rozlišení, senzitivitu a poskytují co nejširší rozsah informací.
- zvýšení citlivost metod prošetřování (screeningu), které by umožnily zmenšit velikost odebraného vzorku nebo by pomohly včas odhalit nízké koncentrace biomarkerů nemoci;
- vysokou specifičnost u kvantitativního zjišťování biomarkerů v komplexních vzorcích;
- větší spolehlivost, jednoduchost při používání a robustnost;
- rychlejší analýzu;
- integraci různých technologií při získávání údajů pro doplňující multiparametrovou analýzu

Hnací silou současného výzkumu je snaha o komercializaci levných uživatelsky příjemných laboratoří na čipu pro centra péče (point-of-care) a prevenci proti nemocem a pro kontrolu zdraví přímo doma.

Výzkum směřuje do následujících oblastí:

- uživatelsky příjemné způsoby přípravy vzorku, které umožní odhalit nepatrná množství markeru nemoci v dostatečně koncentrované kapce krve a rovněž i nepatrná množství rozpuštěná v relativně velkém objemu vzorku, například 5 až 10 rakovinných buněk ve 100 ml moči;
- mimořádně citlivé techniky detekce, které nepoužívají značkování a zaměřují se na rychlejší a uplnější přímé detekování, například s použitím ramének (cantilevers) nebo vodivých polymerů;
- syntetické rozpoznávací prvky jako jsou senzory, za účelem zvýšení citlivosti a specifičnosti rozlišení To vyžaduje vývoj technik povlakování a rozvoj povrchové chemie včetně samosestavování biomolekul, hybridních konjugátů biomateriálů s nanočásticemi nebo molekulárně natištěných polymerů (molecularly imprinted polymers);
- integrovaná komplexní zařízení založená na pokrokové mikro a nanofluidice, která využívají např. aktivní zfunkčnené stěny kanálů, a komplexní protokoly analýz;
- biomimetické senzory používající molekuly jako senzory.

---

<sup>393</sup> European Technology Platform on NanoMedicine „Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for NanoMedicine“, 9/2005, vyd. EC, Luxembourg, str. 18, ISBN 92-894-9599-5.

### 5.5.2.2. Nano-zobrazování *in vivo*

Nano-zobrazování zahrnuje různé přístupy, které využívají techniky výzkumu molekulárních dějů *in vivo* a techniky používané k manipulaci s molekulami. Techniky zobrazování zahrnují moderní optické zobrazování a spektroskopii, nukleární zobrazování s použitím radioaktivních indikátorů, zobrazování s pomocí magnetické rezonance, ultrazvukové a rentgenové zobrazování, přičemž každá z těchto metod závisí na diagnostickém indikátoru nebo na kontrastní látce, která byla zavedena do těla s cílem vyznačit místo onemocnění.

Metoda cíleného molekulárního zobrazování je důležitá pro různorodou a mnohostrannou diagnostiku jako je například určení místa zánětu, vizuální znázornění cévních struktur nebo specifických stavů při onemocněních či anatomické vyšetření. Má rovněž důležitý význam pro výzkum řízeného uvolňování léku, pro odhad distribuce léku a pro včasné odhalení neočekávané a potenciálně nebezpečné akumulace léku. Schopnost vystopovat distribuci léku přivádí k možnosti jej aktivovat pouze tam, kde je to potřeba, a tím lze snížit jeho potenciální toxicitu.

Pro zobrazovací metody v lékařství se v současnosti využívá široká škála částic nebo molekul. V poslední době se vývoj soustřeďuje na využití nanočástic jakožto indikátorů nebo kontrastních látek. Např. fluorescenční nanokrystaly, jako jsou například kvantové tečky, jsou nanočástice, které v závislosti na svém povrchu a fyzikálních a chemických vlastnostech se mohou zaměřit na specifickou tkáň nebo buňku, přičemž je lze pro účely zobrazování upravit tak, aby světélkovaly. Vydávají mnohem intenzivnější fluorescenční světlo, mají dlouhou životnost fluorescence a větší schopnost multiplexování ve srovnání s tradičními materiály. Očekává se, že kvantové tečky budou zvláště užitečné u zobrazování živých tkání, kde jsou signály zatemňovány rozptylem. Provádějí se toxikologické studie, aby se přesně zjistil vliv kvantových teček na člověka, zvířata a na životní prostředí. Nový výzkum je zaměřen na povlakování nanočástic s cílem zlepšit účinnost jejich zacílení a biokompatibilitu.

Hlavním přínosem nano-zobrazování u diagnostiky *in vivo* by mělo být včasné odhalení onemocnění, sledování stádií vývoje choroby (např. u rakovinných metastáz), výběr pacientů, který vede k více osobnímu pojetí v lékařství a vyhodnocení účinnosti léčby nebo chirurgického zásahu v reálném čase.

Cílem výzkumu diagnostiky a zobrazování *in vivo* je vyvinout citlivé, vysoce spolehlivé prostředky detekce, které mohou rovněž i dodat léky do organismu a monitorovat účinky léčby. Jde o koncepci včasné diagnózy, léčby a řízení léčby typu „vyhledej, bojuj proti a sleduj“, která patří do koncepce teranostiky. Pomocí této strategie lze zkoumanou tkáň nejprve zobrazit za pomoci specifických kontrastních nanostruktur. Následně nato může být použita stejná cílená strategie kombinovaná s farmakologicky aktivním činidlem pro léčbu. Nakonec je možné sledovat efekt léčby prostřednictvím postupného zobrazování.

V následujícím období lze předpokládat následující zaměření výzkumu:

**Zkvalitnění detekce** - je nutné vyvinout účinné lékařské kamery za rozumnou cenu, které jsou schopny v jednom kroku získat snímky celého těla a provést komplexní studie při použití mnoha izotopů. Přínosem by bylo výrazné zvýšení výkonnosti při zobrazování celého těla, což je velmi důležité u vyšetření na rakovinu. Kombinace různých způsobů zobrazování je nadějný postup; např. lze kombinovat pozitronovou emisní tomografii se zobrazováním pomocí magnetické rezonance, dále zobrazování magnetickou rezonancí v kombinaci s ultrazvukem nebo se zobrazováním mozku na bázi elektroencefalogramu, dále ultrazvuk s optickými technologiemi, což povede k tomu, že lze mít užitek z každého z těchto systémů. Spojení zobrazování pomocí magnetické rezonance a způsobů optického zobrazování nadále představuje problém. V zásadě to vyžaduje použití fluorescenčních nanočástic jakožto vyzařovačů signálu, které fungují jak v paramagnetickém, tak i infračerveném režimu.

Jakmile toho bude jednou dosaženo, mohou nanotechnologie vést k miniaturizaci detekčních zařízení nebo k dálkovému ovládní signálů. V oblasti velmi přesných měření elektromagnetických polí by vývoj nových rozhraní mezi nanostrukturovanými a/nebo biologicky funkcionalizovanými povrchy vedl k významnému nárůstu kvality při nepřetržitému monitorování biologických parametrů. Výzkum bude rovněž zapotřebí ve zkvalitnění metod analýzy zobrazování a vizualizace, jako je tomu například u intracelulární tomografie v reálném čase, u stereo zobrazování, u virtuální a počítačem rozšířené reality, holografie, zobrazování *in vivo* pomocí optických katetrů a v případě zlepšení kvality lékařských endoskopických nástrojů.

Jestliže se v oblasti molekulárního zobrazování má dosáhnout významného pokroku, je třeba vzít v potaz několik dalších problémů. Např., při zjišťování drobných změn a odchylek je zapotřebí dosáhnout většího odstupu signálu od šumu, zvýšit citlivost měřících technik a zlepšit software zpracování dat. Nakonec je třeba věnovat pozornost i správě velkého množství údajů proto, abychom z výsledků nanometrického zobrazování vytěžili co nejvíce

**Nanočástice jako sondy** – představa nepatrné sondy pronikající do nemocné buňky *in vivo* a podávající zprávu o jejím stavu a případně uvolňující léky je velmi přitažlivá. Nejranější projevy onemocnění jsou v těle naznačeny změnami v živých buňkách, mezi něž patří defektní adheze buněk, buňky vysílají nesprávné signály, vyskytují se mitotické<sup>394</sup> chyby, chyby při nitrobuněčné komunikaci a abnormální cytoplazmatické změny. Předvídá se, že hlavní přínos by měl být v možnosti zobrazit a identifikovat tyto změněné stavy. Různé zobrazovací techniky vyžadují různá zařízení podávající zprávy; například kvantové tečky mohou zpětně „podávat hlášení“ tak, že budou světélkovat, když se setkají s nemocnými buňkami. Není příliš obtížné učinit skok ve vývoji od zařízení, které pouze podává zprávy, k přístroji, který nejenže určí místo vzniku nemoci, ale zároveň dodá i léky; například nanomagnetické částice mohou zpětně informovat tak, že zajišťují zvýšení kontrastu a rovněž se účastní procesu léčby (tato koncepce vyžaduje výzkum v oblasti molekulární genetiky, buněčné léčby a výzkum v oblasti dodávky léku do organismu). Aby bylo možné zvýšit kvalitu podávání zpráv, je třeba provádět další výzkum týkající se projektování a složení nanočástic tak, aby byly schopny snadněji dojít k cíli – k nemocným buňkám, včetně těch buněk, které jsou umístěny za překážkami jako jsou například tkáň epitelu (buněčná výstelka). Dále je potřeba další výzkum, který se bude zabývat vytvořením „nanočástice pro všechny účely“, která může být zobrazena různými prostředky, jež existují (tj. optickými, akustickými, magnetickými apod.). Odhlédneme-li od zjišťování nemoci a doručení léků, je rovněž důležité označovat specifické typy buněk netoxickou látkou, a to z důvodu zobrazování nitrobuněčné dopravy. Úsilovně je rovněž zapotřebí pracovat na zlepšení biokompatibility implantovaných nebo dočasně v těle umístěných zařízení podávajících signály a zprávy, na minimalizaci jakékoli potenciální toxicity, na zmírnění alergických a zánětlivých reakcí, přičemž je nutné vzít v potaz přirozenou eliminaci, která brání možnému dlouhotrvajícímu účinku. Je také nutný výzkum týkající se opouzdření kontrastních látek s cílem usnadnit jejich doručení na cílové místo, nebo výzkum zabývající se připojením specifických linkerů (spojníků) za účelem přidání nových vlastností.

Vývoj nových nano-sond pro účely molekulárního zobrazování v zásadě vyžaduje společný postup více vědních oborů a také informovanost o objevech ve vědě o materiálech a jejich transfer (informace o nanostrukturách jako jsou například částice, trubice, pouzdra, fullereny, dendrimery, nové polymerní struktury apod.).

---

<sup>394</sup> **Mitóza** – dělení jádra eukaryontní buňky. Každé dceřinné buňce je předán úplný genetický materiál. Součástí tohoto procesu je replikace DNA.



**Kombinované techniky** - nanotechnologie nabízejí významný přínos ve zlepšení kvality zařízení pro detekci a ve značkování indikátorů nemoci, které jsou podávány *in vivo*. Mocné hnací síly spočívají v synergii, která například nastává u diagnostiky *in vitro* (sondy a markery) v kombinaci se zobrazováním *in vivo*; nebo u vývoje kontrastní látky/sondy (u dodávky léku do organismu a/nebo u toxokologických studií) v kombinaci s technologií zobrazování (lékařské vybavení nástroji). Kombinace lékařské diagnostiky *in vitro* spolu s nanometrickým zobrazováním *in vivo* by mohla vést k cílenému rozpadu nebo odstranění tumoru: označené rakovinné buňky se zfunkčněními nanočásticemi, které reagují na vnější stimul, umožňují lokalizovaný chirurgický zákrok *in situ* (rozbití částic nebo jejich zahřátí pomocí laseru, magnetickými poli, mikrovlnami apod.), aniž by zákrok byl vůči lidskému tělu příliš invazivní.

### 5.5.3. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Tkáňové inženýrství je založeno na vytváření nových tkání *in vitro* s jejich následujícím chirurgickým umístěním v těle nebo na stimulaci potřebné opravy (regenerace) poškozené tkáně *in situ* použitím biokompatibilních umělých struktur nebo implantátů živých buněk zavedených do nebo blízko oblasti poškození. Výzkumná činnost v tomto oboru byla zahájena kolem roku 1985 (Y.C.Fung z University of California, San Diego)<sup>395</sup>. Poprvé definovali obor „tkáňové inženýrství“ (tissue engineering) pravděpodobně R. Langer a J.P.Vacanti v roce 1993 v publikaci, která byla již více než 1000x citována<sup>396</sup>. Do praktického používání však bylo doposud dovedeno jen několik produktů tkáňového inženýrství. Důvodem je jednak skutečnost, že vývoj nových produktů trvá dlouhou dobu a je velmi nákladný (viz část 5.4.1.), jednak to, že většina firem působících v oblasti tkáňového inženýrství a buněčných terapií je malých, s omezenými možnostmi<sup>397</sup>. Potenciál pro aplikace produktů tkáňového inženýrství se však jeví jako velmi velký – **obr. č. 82**.

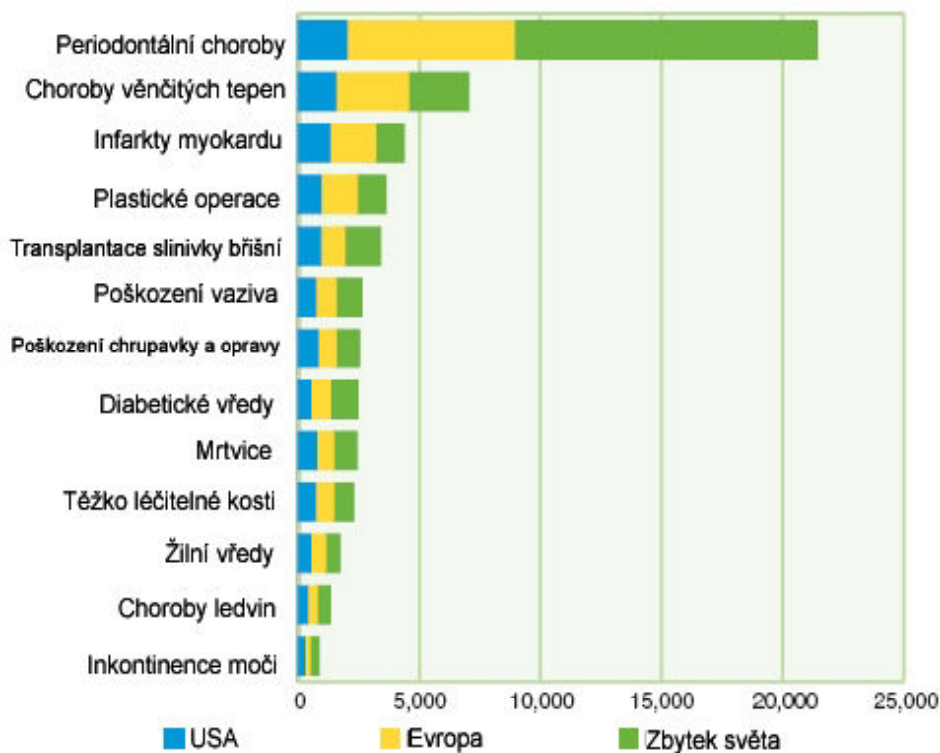
Ve výzkumu se řeší i další závažné medicínské problémy: rostoucí chrupavka (např. v ÚEM AV ČR), jaterní a neuronové kmenové buňky z vlastních buněk pacienta, regenerace buněk slinivky břišní, nový růst ostrůvkových buněk a jejich transplantace do jater, stimulace dospělých buněk, jako např. bílých krvinek, odvozených ze vzorků pacientovy krve a mnoho dalších.

Tkáňové inženýrství řeší problémy pomocí živých buněk, které se používají jako konstrukční materiál. Může to být umělá kůže, která obsahuje živé fibroblasty, chrupavka opravitelná živými chondrocyty nebo jiné druhy buněk. Z tekutých tkání, jako je krev, jsou buňky extrahovány objemovými metodami, např. odstředováním. Z pevných tkání je extrakce mnohem obtížnější. Obvykle se tkáň rozseká a poté se zpracovává enzymy (trypsin, kolagenáza), aby se odstranila extracelulární matrix. Po tomto zpracování buňky volně plovou a mohou být odstředěny. Buňky se zpravidla dělí na autologní pocházející ze stejného pacienta, kterému jsou opět reimplantovány, na alogenické pocházející od dárce stéjněho živočišného druhu a xenogenické izolované z jednotlivce jiného druhu, na izogenické izolované z geneticky identického organismu (dvojčata, klony), atd. Kmenové buňky jsou nediferenciované prekurzorové buňky, ze kterých mohou vznikat různé klony specializovaných buněk.

<sup>395</sup> Viola J., Lal B. Grad O. „The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field“, 10/2003, [www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/start.htm](http://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/start.htm)

<sup>396</sup> Langer R, Vacanti J.P. „Tissue Engineering“, Science, 260, 1993, str. 920.

<sup>397</sup> „Tissue Engineering: Promises, Potential, and Many Challenges“, MedMarket, 4, 2005, str. 1, [www.medilligence.com](http://www.medilligence.com).  
Marsh G. „Tissue Regeneration – the Material Enablers“, Materialstoday, 5/6 2001, str. 39.



**Obr. č. 82** Potenciál tkáňového inženýrství a buněčné terapie ve vybraných aplikacích (Počet případů použitých chirurgických postupů v roce 2005, v tis.).

Upravené buňky jsou implantovány do umělých struktur schopných podporovat trojrozměrnou tkáňovou formaci. Tyto struktury (často nazývané „kostry“) slouží nejméně pro jeden z následujících účelů: a) umožňují připojení buněk a jejich migraci, b) dodávají a zachycují buňky a biologické faktory, c) umožňují difúzi životně důležité buněčné výživy a produktů genové exprese, d) pro modifikaci vlastností buněk vykonávají určité mechanické a biologické funkce.

Kostry musí splňovat určité specifické požadavky:

- Pro zajištění přichycení buněk a difúze buněk i výživných látek strukturou musí být vysoce porézní s přiměřenou velikostí pórů.
- Jelikož se předpokládá, že kostra bude absorbována prostředím, musí být z biodegradovatelného materiálu. Rychlost biodegradace by měla být úměrná rychlosti růstu nové tkáně. Pro klinická použití je důležité, aby materiál kostry mohl být injektován.
- Materiál kostry by měl být biokompatibilní – viz **Tab. č. VI**.

### 5.5.3.1. Materiály a způsoby syntézy koster pro podporu tkání

#### 5.5.3.1.1. Materiály

Všeobecně se pro materiál koster prozatím používají různé polymery. Nanovláknité kostry jsou teprve v vývoji. V přehledu<sup>398</sup> nalezneme následující druhy“

<sup>398</sup> Ma P.X. „Scaffolds for Tissue Fabrication“, *Materialstoday*, 5/2004, str. 30.

- Materiály pro porézní kostry v tuhém stavu:
  - a) Lineární alifatické polyestery (PGA - poly-glykolová kyselina, PLGA – kopolymery poly-glykolové kyseliny, PLA – poly-mléčná kyselina, PCL – poly-kaprolakton, PHB – poly-hydroxybutyrát)
  - b) Přírodní makromolekuly (proteiny /kolagen/, polysacharidy /chitosan, hylauronát, alginát/, hedvábí).
  - c) Anorganické materiály(bioaktivní sklo, kalciumfosfáty /HAP aj./).
- Materiály pro hydrogelové kostry: PEG – poly-etylenglykol, PIPA – poly-isopropylakrylamid, PAC – poly-akrylová kyselina, kolagen, fibrin, elastin.

Nejvíce se používá PLA (poly-mléčná kyselina), což je polyester, který v těle degraduje za tvorby kyseliny mléčné (snadno se z těla vylučuje). V uvedených případech se nejedná o nanomateriály.

- Nanovláknité kostry z peptidů a proteinů (kolagen) jsou předmětem vývoje. Příkladem takového materiálu, který je nyní již ve fázi zkoušení, je PuraMatrix™ - **obr. č. 38**.

#### 5.5.3.1.2. Vybrané způsoby syntézy koster

Pro syntézu koster pro tkáňové inženýrství byla vyvinuta řada metod charakteru makro – a mikrotechnologií, např.:

- Molekulární samosestavování nanovláken. Vytvářejí se biomateriály s vlastnostmi podobnými jako má přírodní *in vivo* extracelulární matrix. Navíc, tyto hydrogelové kostry prokazují nízkou toxicitu *in vivo* a biokompatibilitu, ve srovnání s tradičními makrostrukturami nebo materiály odvozenými ze zvířat. Příkladem je uvedený syntetický peptidový hydrogel PuraMatrix™.
- Textilní technologie. Jde o přípravu netkaných sítí různých polymerů, např. metodou elektro-spinning. Vlákna kostry mají průměr 200 – 500 nm. Problémem jsou potíže se zajištěním vysoké porozity a pravidelného rozměru pórů – viz **obr. č. 75 a 76**.
- Odlévání rozpouštědla a vymývání částic. Tato metoda dovoluje přípravu porézní struktury s rovnoměrnou porozitou, ale s omezenou tloušťkou. Dalším nedostatkem je použití organických rozpouštědel, které musí být dokonale odstraněny, aby nedošlo k poškození buněk v kostře. Metoda spočívá v rozpuštění polymeru ve vhodném organickém rozpouštědle (např. se rozpustí PLA v dichlormetanu), následujícím odléváním roztoku do formy zaplněné částicemi porogenu. Porogenum mohou být anorganické soli jako NaCl, krystaly sacharózy, želatinové nebo parafinové kuličky. Rozměr částic porogenu ovlivňuje rozměr pórů kostry. Poměr polymer/porogen přímo souvisí s objemem porozity v konečné struktuře. Po odlití polymeru se rozpouštědlo odpaří a kompozit vzniklý ve formě se ponoří do lázně s vhodným rozpouštědlem, aby se porogen rozpustil (např. do vody v případě použití NaCl atd.). Po rozpuštění porogenu se získá porézní struktura.
- Zpěnění plynem. Pro překonání nezbytnosti použití organických rozpouštědel a tuhého porogenu byla vyvinuta technologie využívající jako porogenu plyn. Nejprve se z polymeru vytvoří struktura diskovitěho tvaru vytlačení polymeru do vyhřáté zápustky. Disk se poté umístí na několik dní do nádoby s vysokotlakým CO<sub>2</sub>. Tlak uvnitř nádoby se postupně snižuje na atmosferickou úroveň. V průběhu tohoto postupu molekuly CO<sub>2</sub> vytvářejí póry a uvolňují se z polymeru. Výsledkem je houbovitá struktura. Nedostatkem je, že póry nejsou navzájem propojeny.
- Tištění buněčných vrstev. V. Mironov et al předložili pro vytváření tkání metodu nazvanou „počítačem podporované, na vstřikování založené, 3D tkáňové

inženýrství<sup>399</sup>. Tištění tkání sestává ze tří etap: a) příprava návrhu tkáně, b) aktuální tištění tkáně, c) úprava a urychlené zrání tkáně. Bylo vyvinuto zařízení schopné tisknout gely, jednotlivé buňky i buněčné agregáty. Jako matrice sloužily tenké vrstvy tepelně reverzibilního gelu, které byly pokládány ve vrstvách za současného tuhnutí. Tímto způsobem byly natištěny do „stohu“ uložených kruhů endoteliální buňky (ploché buňky vystylající cévy). Po inkubaci tyto buňky vytvořily trubice.

### 5.5.3.2. Regenerace tkání – přínos nanotechnologií

V poslední době se intenzivně sleduje metoda *in situ* regenerace nemocné nebo poškozené tkáně. Hovoří se o **regenerační medicíně**. Tato metoda může být realizována nejen díky hlubšímu pochopení základní biologie regenerace tkání – hojení ran v tom nejširším smyslu – ale rovněž i v důsledku vývoje účinných postupů a nástrojů, které budou iniciovat a řídit proces regenerace.

Příroda umí regenerovat a opravovat poškozené tkáně, což se snažíme napodobovat. Jak jsme již uvedli, napodobováním přírody se zabývá biomimetika. Filosofii biomimetiky lze zhustit do tří základních prvků: inteligentní biomateriály, bioaktivní signální molekuly a buňky. V oblasti biomateriálů a biotechnologie byl zaveden termín „biomimetika“, který popisuje proces simulace toho, co se děje v přírodě.

#### 5.5.3.2.1. Inteligentní biomateriály a chytré implantáty

Biomateriály třetí generace, které zahrnují degradabilní polymery ovlivněné na molekulární úrovni s cílem vyvolat specifické reakce buněk, vzbuzují velkou naději, že by mohly sloužit jako podpůrné skelety nebo matrix při regeneraci tkání. Tyto „inteligentní“ biomateriály jsou zkonstruovány tak, aby reagovaly na změny v nejbližším prostředí a stimulovaly specifickou reakci buněk na molekulární úrovni. Úpravy molekul u vstřebatelných polymerních systémů vyvolávají specifické reakce s buňkami a způsobují přímé dělení buněk, jejich diferenciaci, uspořádání a výrobu extracelulární matrix. Tak například se vyvíjejí nové generace syntetických polymerů, které mohou v reakci na změny teploty, pH, na elektrický podnět nebo na energetický stav změnit svou molekulární strukturu .

Dostupnost nanotechnologií umožnila vědcům, kteří se zabývají materiály, najít úplně novou perspektivu v oblasti imitace různých typů extracelulárních matrix přítomných ve tkáních. Nyní jsou k dispozici techniky, pomocí nichž lze vyprodukovat makromolekulární struktury o nanometrické velikosti s jemně regulovanou stavbou a strukturou. K výrobě celé škály struktur jako jsou například nanovlákná o různých a přesně stanovených průměrech a s různou morfologií povrchu, porézní podpůrné skelety z nanovláken, nanodrátů a nanošablon, nanokoulí, dendrimerů, nanokompozitů a jiných makromolekulárních struktur, bylo použito tradiční polymerní chemie v kombinaci s novými technikami jako je například elektrospinning (viz 5.3.7.), elektronová litografie a samosestavování.

Pomocí nanotechnologie lze také zdokonalit nevstřebatelné biomateriály a účinněji řídit biologické interakce na nanometrické úrovni, což mimořádně zkvalitní funkčnost a životnost implantovaných materiálů. Tím, že na povrchu implantátů použijeme bioaktivní povlaky z nanočástic, je možné spojit implantát s vedlejší tkání mnohem přirozeněji a významně tak prodloužit životnost implantátu. Podobně bude možné i obklopit implantovanou tkáň nanometrickou ohradou, která by zabraňovala aktivování potlačujících mechanismů hostitele, a tím umožnit širší využití darovaných orgánů. Nanomateriály a /nebo nanokompozity se zlepšenými mechanickými vlastnostmi by mohly nahradit materiály, které vykazují únavové

<sup>399</sup> Mironov V. et al „Organ Printing: Computer-aided Jet-based 3D Tissue Engineering“, Trends in Biotechnology, 21, 2003, str. 157.

poruchy vlivem iniciace trhliny a jejího šíření při podmínkách fyziologické zátěže. Nanomateriály se zlepšenými elektrickými vlastnostmi, které zůstávají funkční po dobu trvání implantace, by mohly nahradit tradiční materiály používané v nervové protetice, jejichž výkon se v průběhu doby zhoršuje. Je možné zkonstruovat bioaktivní skla a makroporézní pěny s cílem aktivovat geny, které by stimulovaly regeneraci živých tkání. Na základě pochopení základních vlastností stahování a propulze tkání lze vyrobit biomateriály, které budou mít nanometrické vlastnosti, jež budou představovat vtištěné vlastnosti specifických proteinů.

Závěrem lze říci, že nanotechnologie může významně pomoci ve vývoji biomimetických inteligentních biomateriálů, které jsou zkonstruovány tak, aby pozitivně reagovaly na změny ve svém nejbližším okolí a stimulovaly specifický proces regenerace na molekulární úrovni s cílem vyrobit zdravou tkáň.

#### 5.5.3.2.2. Bioaktivní signalizační molekuly

Bioaktivní signalizační molekuly jsou takové molekuly, které se přirozeně nacházejí v buňkách (hormony, růstové faktory, receptory, nervové mediátory ap.) a jež spouštějí regenerační proces na buněčné úrovni. V současnosti nejdostupnější léčba se zakládá na signalizačních molekulách a spočívá v neřízené dodávce jediného růstového faktoru – což je evidentně přílišné zjednodušení vzhledem ke komplikovanosti, s jakou probíhá kaskádovitý proces hojení živých tkání zejména u chronických patologických případů. Postupná signalizace je při výrobě a opravě tkání podstatná; z tohoto důvodu je rozhodující vývoj technologií pro postupnou dodávku proteinů, peptidů a genů.

Správné bioaktivní signalizační molekuly, které mají zahájit a řídit proces regenerace, se získávají tak, že se konstruují bioaktivní materiály a kódují se biologické signály, jež jsou pak schopny spustit biologické děje. Hlavním cílem je vyvinout extracelulární materiály s vlastnostmi jako matrix, a to buď kombinací přírodních polymerů nebo vývojem struktur počínaje syntetickými molekulami kombinovanými s matricelulárními podněty. Tím, že znehybníme specifické proteiny, peptidy a jiné biomolekuly na materiálu, je možné provést imitaci prostředí extracelulární matrix (ECM) a zajistit multifunkční povrch s buněčnou adhezí. Faktory rozpoznávání a specifikace buněk mohou být začleněny do vstřebatelného polymerního povrchu včetně adhezivních proteinů, fibronektinu nebo funkčních domén komponentů ECM. Polymerní povrchy mohou být upraveny pomocí proteinů, které ovlivňují interakce s buněčnou výslepkou cév, synaptický vývoj a stimulaci neuritů<sup>400</sup>.

Abychom dosáhli jakéhokoli pokroku, je nezbytné pochopit ty molekulární interakce, které vedou k regeneraci, a je třeba vyvinout technologie pro postupnou dodávku proteinů, peptidů a genů s cílem napodobit signalizační kaskádu. Použití nanotechnologií lze při vývoji léčebných metod, které spočívají v aktivaci a časovo-prostorovém řízení regenerace tkání *in vivo*, oddůvodnit..

#### 5.5.3.2.3. Buněčná terapie

Buněčná diferenciací se vyskytuje u savců jako součást embryologického vývoje a pokračuje v dospělosti jako součást normální buněčné proměny nebo se buňky dělí při opravě, která následuje po poškození. Růst z buněčného hlediska znamená neustálý proces buněčné proměny, který závisí na přítomnosti sebeobnovujících se kmenových buněk, jež dávají vzniknout progenitorovým a zralým buňkám. Je známo, že buněčná proměna probíhá v určitých tkáních rychle, například ve střevním epitelu, krvi a epidermis (pokožka), a jinde pomalu, například v kostech a v chrupavkách; dále se má za to, že tato buněčná proměna je

---

<sup>400</sup> **Neurit** – výběžek nervové buňky.

velmi omezená nebo neexistuje v takových tkáních jako je mozek a srdce. Výsledky vědeckých výzkumů v posledních letech však dokonce i u těchto tkání radikálně změnily pohled na schopnost regenerace po ischemickém poškození. Tento posun v náhledu na problém přiměje výzkum se soustředit na pochopení mechanismů, kterými jsou kmenové buňky doplňovány, aktivovány, řízeny a naváděny na cíl..

Regenerační lékařství bude v budoucnosti své úsilí soustřeďovat především na to, jak efektivně využít ohromného potenciálu samočinné opravy, který byl pozorován u zralých kmenových buněk. Vzhledem k logistické složitosti a nákladům, které jsou spojeny s dnešní léčbou, která se děje prostřednictvím tkáňového inženýrství a spočívá v autologní reimplantaci kultivovaných diferencovaných buněk, bude muset být léčba příští generace stavěna na pokroku v tkáňovém inženýrství a pochopení obrovského potenciálu terapie na bázi buněk, která používá i nediferencované buňky. Nanotechnologie může pomoci při dosažení dvou cílů – rozpoznat signalizační systémy s cílem zapůsobit na potenciál samočinného hojení endogenních zralých kmenových buněk a dále vyvinout účinné systémy zacílení pro léčbu pomocí zralých kmenových buněk, např. jejich označováním..

Závěrem lze říci, že buněčná terapie by měla být zaměřena na to, aby byly zralé kmenové buňky efektivně získávány, aby byla vzata v úvahu krátká preimplantace, stádium kultivace nebo, pokud možno, aby došlo k okamžitému intraoperativnímu podání s použitím inteligentního biomateriálu, který by sloužil jako biointeraktivní nosič léčiva. Ohromný dopad by měla také schopnost implantovat bezbuněčné, inteligentní, bioaktivní materiály, které by účinně zajišťovaly signalizaci, čímž by působily na potenciál samočinného hojení, který mají pacientovy vlastní kmenové buňky.

### 5.5.3.3. Další zaměření výzkumu

Vysoký potenciál využití tkáňového inženýrství a regenerační medicíny vede k závěru, že základní a aplikovaný výzkum by se měl v budoucnu zaměřit nejen na molekulární biologii a kmenové buňky, ale i na biomateriály. Řešení tohoto komplexního problému vyžaduje interdisciplinární přístup. Předpokládají se výzkumné práce v následujících směrech<sup>401</sup>:

- Vývoj „inteligentních“ multifunkčních biomateriálů
- Řízení struktury materiálů v nanorozměrech při konstrukci inteligentních koster. To rovněž vyžaduje výzkum v oblasti mikro- a nanovýroby při vytváření struktur s řízenou adhesí a bujení buněk a s různými funkcemi.
- Technologie vývoje nové generace syntetických polymerů, které mohou měnit svoji molekulární konformaci v závislosti na externích stimulech (teplota, pH, elektrické pole ap.)
- Technologie bioaktivních nanopovlaků
- Zařízení obsahující nanodráty a nanopóry pro stimulaci a bioindikaci buněk uvnitř umělé matrix
- Výzkum kmenových buněk zaměřený na porozumění potenciálu a plasticity dospělých kmenových buněk
- Vývoj technologií pro mininvazivní, na dané místo zaměřenou buněčnou terapii
- Výzkum prováděný v nanometrickém měřítku zaměřený na generaci znalostí o interakcích různých typů buněk v jejich daném prostředí
- Monitorování regenerace tkání
- Zkoušení toxicity syntetických nanočástic *in vitro* a *in vivo*

<sup>401</sup> „European Technology Platform on NanoMedicine – Nanotechnology for Health“, Vision Paper, European Commission, Luxembourg, 9/2005, str.31.

#### 5.5.4. PŘÍNOS NANOTECHNOLOGIÍ K TERAPII RAKOVINY

Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem, pro který je charakteristický nekontrolovaný růst s ničením okolních tkání, zakládání metastáz a celkové působení na organismus. Celosvětově se jedná o jedno z nejdůležitějších onemocnění. Stejně je tomu v České republice, kde onemocní různými druhy rakovin cca 65000 obyvatel ročně. Předpokládá se, že s rakovinou se v EU a USA setká v průběhu svého života jeden muž ze tří a jedna žena ze čtyř. Nemoc je stále na postupu.

Různé typy rakoviny (nádory dýchacího ústrojí, zažívacího traktu, ženského a mužského genitálního traktu, ledvin a odvodných cest močových, neuroektodermální nádory a jiné typy solidních nádorů<sup>402</sup>) se léčí v současné době čtyřmi způsoby:

- Chirurgická léčba
- Radioterapie
- Genotoxická chemoterapie
- Bioterapie

Prvé tři způsoby, které se leckdy kombinují, patří k tradičním metodám léčby a přinášejí pacientům značné obtíže. Bioterapie, i když jsou vyvíjeny zejména v posledních 10 letech, patří k nejméně poznaným, ale nejperspektivnějším oblastem léčby rakoviny. Rozvoj bioterapie umožnily pokroky ve výzkumu molekulární biologie, genetiky a imunologie, když byly podhaleny mechanismy, kterými dochází k transformaci normálních buněk a byly poněkud korigovány představy o patofyziologii nádorového procesu<sup>403</sup>. Rozvoj bioterapie komplikuje to, že nitrobuňeční pochody jsou velmi složité. Obvykle podnět ke spuštění kaskády nitrobuňečných pochodů přichází v podobě růstového faktoru, který ve vazbě na specifický receptor zahájí řetězec dalších změn, jež vyústí v abnormální transkripci, blokování apoptózy a ve stimulaci proliferace, angiogeneze a metastázování<sup>404</sup>. Výzkum terapeutických cílů se tedy zaměřuje na jednotlivé etapy uvedených nitrobuňečných pochodů. Zkoumají se a vytvářejí léčiva pro inhibici růstových faktorů, receptorů pro růstové faktory, signálního přenosu, telomerázy, regulačních proteinů buněčného cyklu, transkripce, proteasomu<sup>405</sup>, apoptózy, angiogeneze i metastázování. Současně se studují možnosti odblokování supresorických faktorů, které fyziologicky brání imunitní reakci vůči nádoru nebo protinádorové reakci. Uvedená výzkumná činnost je doménou genetiky, transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky – **obr. č. 29**.

Současnou situací v léčbě rakoviny a její prevencí se v posledních letech začali zabývat WHO (World Health Organisation), orgány Evropské unie i jejich členských států i US Department of Health and Human Services a americký National Cancer Institute. Na doporučení WHO z roku 2003 mnoho států zpracovalo svoje národní programy boje proti rakovině.

##### 5.5.4.1. Onkologický program České republiky (NOP)

V České republice byl v průběhu roku 2004 vyhlášen Onkologický program České republiky (NOP)<sup>406</sup>:

<sup>402</sup> Kolář Z. „Základní poznatky o molekulárních mechanismech vývoje některých epitelových, solidních mesenchymových a neuroektodermových nádorů“, Klinická onkologie, 17, 3/2004, str. 77, [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).

<sup>403</sup> Klener P. „Protinádorová chemoterapie pro 21. století“, Klinická onkologie, 16, 6/2003, str. 243.

<sup>404</sup> **Apoptóza** – řízená smrt buňky, **proliferace** – novotvoření tkáně, **angiogeneze** – novotvorba cév

<sup>405</sup> **Proteasom** – velký proteinový komplex v cytosolu buňky

<sup>406</sup> [www.onconet.cz](http://www.onconet.cz), [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz).

### Cíle:

Snižování incidence a mortality nádorových onemocnění.

Zlepšení kvality života onkologicky nemocných.

Racionalizace nákladů na diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění v ČR.

### Strategie:

Boj se zhoubnými nádory jako součást celorepublikové i regionální politické agendy.

Boj se zhoubnými nádory jako životní zájem laické i odborné veřejnosti.

Mezinárodní kooperace a harmonizace v rámci partnerských struktur EU a WHO.

Trvalá udržitelnost programu boje s rakovinou kontrolou nákladů.

Stanovení a průběžné vyhodnocování indikátorů, výstupů (outputs) a výsledků (outcomes), fungování a účinnosti NOP. Každoroční komentář k plnění, případně revize a doplňování.

### Úkoly:

- 1) Na školách odborná podpora výuky prevence nádorů. Na veřejnosti popularizace primární prevence nádorů. Snížit zejména kouření mládeže a žen. Pomáhat kladným změnám ve výživě a v životním stylu.
- 2) Zajistit dlouhodobé fungování a audit programů pro skríníng karcinomu prsu, karcinomu hrdla děložního a karcinomu kolorekta. Vyhodnocovat zároveň vliv paraskríníngových vyšetření v populaci.
- 3) Zlepšit časnou diagnostiku zhoubných nádorů, zejména ve spolupráci s praktickými lékaři. Inovovat náplň preventivních prohlídek, integrujících záchyt onkologických, kardiovaskulárních a metabolických onemocnění.
- 4) Pojmenovat síť center komplexní diagnostiko-léčebné onkologické péče, akreditovaných ČOS na principu čtyř kompetencí: kvalifikace, vybavení, sebeevaluace a komunikace. Vytvořit Radu onkocenter České republiky jako nástroj pro koordinaci práce.
- 5) Prosazování ekvity čili pokrytí populace srovnatelnými onkologickými službami a přístupem k informacím o prevenci, diagnostice a léčbě onkologických onemocnění.
- 6) Zajistit ukotvení a stabilitu zařízení pro paliativní a terminální péči. Podpořit rozvoj domácí péče. Sledovat stav kvality života a léčby bolesti nemocných s pokročilými zhoubnými nádory.
- 7) Podpora kontinuity, stabilizace, modernizace a praktického využívání databáze Národního onkologického registru ČR pro řízenou preventivní a diagnosticko-léčebnou péči v onkologii.
- 8) Podpora aplikovaného onkologického výzkumu a inovací. Zavádění principů HTA (health technology assessment) v onkologii. Podpora vzdělávání v onkologii.

Program se realizuje pod garancí České onkologické společnosti. V době vydání této publikace byla podle bodu 4) NOP ustavena již řada onkologických center v Praze a jednotlivých krajích.

#### **5.5.4.2. Podpora výzkumu rakoviny v ČR**

Bod 8) NOP doporučuje podporu aplikovaného výzkumu rakoviny. Jaké programy v současné době umožňují, aby se vědecké a výzkumné týmy v ČR ucházely o granty a programové projekty? V současné době jsou tyto možnosti:

- **Ministerstvo zdravotnictví ČR** vyhlásilo na léta 2004-2009 „Resortní program výzkumu MZ“, v jehož rámci je každoročně vyhlašováno výběrové řízení na dílčí program XC – Nádorová onemocnění. Dílčí program je zaměřen na epidemiologii, prevenci, diagnostiku a léčbu maligních chorob. Jeho cílem je snížení incidence nádorů a onkologické morbidity při aplikaci preventivních opatření, snížení incidence i mortality nádorové nemoci v populaci, snížení onkogenní zátěže jedince i populace,



snížení mortality na nádorové choroby včasnou diagnostikou a moderní komplexní terapií, zvýšení efektivity terapeutického zákroku na úrovni kauzální i paliativní, individualizace léčby zhoubných nádorů pomocí využívání a multifaktoriálního vyhodnocování prediktivních parametrů.

- **Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR** vyhlásilo na léta 2006-2013 tematický program (TP2) Národního programu výzkumu II s názvem „Zdravý a kvalitní život“. Ze 14 tematických oblastí se výzkumu rakoviny týkají oblasti:
  - a) T2-2-1 Vyvinutí nových diagnostik založených na molekulárně-biologických metodách (nové postupy umožňující výrobu originálních nových diagnostik tuzemského původu).
  - b) T2-2-2 Molekulární genetika a biotechnologie pro nová léčiva (nové postupy umožňující identifikaci vhodných cílových molekul pro přípravu nových léků a vakcín s využitím poznatků z funkční genomiky, strukturální biologie a proteomiky). Výzkum se zaměří zvláště na novou generaci léčiv a lékových forem umožňujících cílenou terapii a řízené uvolňování léčiv, na originální struktury s novými mechanismy antibakteriálních, antivirových, imunomodulačních a protizánětlivých účinků a na zvýšení účinnosti chemoterapie nádorů.
  - c) T2-2-3 Nanomateriály pro aplikace v biologii a medicíně (nové postupy umožňující vyvinutí nových typů magnetických hybridních nanokompozitních materiálů se specifickými vlastnostmi, např. kontrastních látek pro magnetickou rezonanci a látek pro cílenou terapii nádorových onemocnění).
  - d) T2-2-6 Genomika, proteomika a diferenciací buněk u onkologických chorob (nové postupy umožňující vytipovat pomocí kombinace genomických a proteomických technik markery specifické pro nádorová onemocnění, vhodné pro screening a časnou diagnostiku laboratorními nebo zobrazovacími technikami, a určit faktory odpovědné za primární a sekundární rezistenci k protinádorové léčbě, nalézt kandidátní cílové molekuly pro specifickou terapii nádorů a prekanceróz a rozpoznat klíčové dědičné faktory odpovědné za zvýšené riziko vzniku nádorů).
- **Akademie věd České republiky** vyhlásila v roce 2006 dvě veřejné soutěže na podávání návrhů projektů do programu „Nanotechnologie pro společnost“, zejména do podprogramu 2 – Nanobiologie a nanomedicína“.

Cíle podprogramu:

- Využít nanostruktury a nanokomplexy, včetně hybridních materiálů ovladatelných vnějším magnetickým polem, pro nové lékové formy, diagnostika, kontrastní látky a nosiče, zajišťující cílený transport těchto látek či přenos genové informace, jejich aktivaci a biodegradaci v organismu.
- Navrhnout nové biosensory a diagnostické systémy umožňující citlivou detekci molekulárních objektů a podpořit zavádění moderních nanotechnologických materiálů a metod do zdravotnické praxe v ČR.

Priority podprogramu:

- Cílený transport biologicky aktivních látek a nanosystémů pro diagnostiku, terapii či radioterapii, např. pomocí polymerů či „molekulárních nádob“. Výzkum lékových forem, kontrastních látek a diagnostik založených na biodegradovatelných (zejména polymerních systémech), umožňujících vazbu

léčiv, případně diagnostik a dalších biologicky aktivních molekul jako jednotek zajišťujících orgánově či buněčně-specifickou dopravu celého systému v živém organismu a jeho specifickou aktivaci v požadovaném místě účinku. V ideálním případě by tento systém měl fungovat jako diagnostikum a zároveň i specifické terapeutikum. Zásadní je transport chemoterapeutik a radioterapeutik určených především pro léčbu nádorových onemocnění.

- Magnetické nanočástice pro lékařské účely. Důraz bude kladen na hybridní materiály skládající se z magnetických jader a biokompatibilního makromolekulárního obalu, kdy vnějším magnetickým polem lze ovládat jejich transport, distribuci a chování. Tyto nanočásticové systémy by měly sloužit *in vivo* v diagnostice i terapii, jako cílený transport léků, chemoterapeutik a radioterapeutik i jako kontrastní látky pro zobrazovací magnetickou rezonanci a lokální destrukci rakovinných nádorů magnetickou hypertermií.
- Biofunkcionalizace povrchů. Jde o pochopení fundamentálních procesů ovlivňujících interakci molekulárních objektů na površích kovů a polovodičů, jejich tvorby či samospořádání. Důraz bude kladen na nano-biotechnologie pro vytváření definovaného rozhraní mezi biologickým a nebiologickým prostředím umožňujícím dosažení specifické biologické aktivity, např. tvorbu, regeneraci a rekonstrukci buněk a tkání (bioinženýrství) a vytváření biokompatibilních povrchů lékařských přípravků, zařízení a přístrojů a úpravě povrchů specificky reagujících na přítomnost vybraných molekul (detekční systém biosensorů) a to nejen pro lékařské využití.
- Biosenzory a diagnostické systémy. Výzkum diagnostických systémů a čipů založených na povrchové modifikaci nanovláken, mřížek nebo citlivých snímačů protilátek specifických proti různým molekulám. Interakce i malého množství molekul s protilátkami a s tím spojená vysoce citlivá změna vodivosti nebo dalších vlastností by měla být využita pro jejich specifickou detekci.
- Polymerní nanokomplexy pro přenos genové informace a genové terapie. Příprava, studium vlastností a výzkum komplexů DNA umožňujících *in vivo* účinný cílený transport genové informace do předem vybraných typů buněk a nebo používaných jako systémy zajišťující účinnou transfekci více typů buněk a využití pro terapii.
- Supramolekulární vytváření nanostruktur. Pro biomedicínské využití je zásadní vytváření umělých nanostruktur řízeným sestavováním cíleně připravených molekulárních stavebních prvků. To je, spolu s maximálním využitím samosestavování, kovalentní i nekovalentní vazby, jedním z cílů supramolekulární chemie.

Čeští vědci a výzkumníci se mohou zapojit i do řešení projektů v rámci evropských programů, zejména:

- 6. rámcový program EU ve výzkumu a technickém rozvoji – tematická priorita „Vědy o životě, genomika a biotechnologie pro zdraví“
- 7. rámcový program EU ve výzkumu a technickém rozvoji – okruh „Spolupráce“, priorita „Zdraví, potravin, zemědělství a biotechnologie“.

Z provedeného výčtu vyplývá, že se objevily první programy podporující projekty zahrnující nanotechnologie.

### 5.5.4.3. Cancer Nanotechnology Plan

Cancer Nanotechnology Plan (CNP) je strategická iniciativa pro přeměnu klinické onkologie a základního výzkumu řízenou aplikací nanotechnologií vyhlášená v červenci 2004 americkým Ministerstvem zdraví a služby lidem, Národními ústavem zdraví (NIH) a Národním ústavem pro rakovinu (NCI)<sup>407</sup>. Plán s předpokládanou účinností do roku 2015 vychází z představy, že nanotechnologie nabízejí bezprecedentní příležitost pro studium interakcí normálních a rakovinných buněk v reálném čase na molekulární (nanometrické) a buněčné úrovni a v průběhu ranných stadií rozvoje rakovinného procesu. Předpokládá se, že nanotechnologie poskytne:

- Látky a diagnostika včasného zobrazení dovolující odborníkům na klinickou medicínu zjistit rakovinu v jejím nejranějším, snadno léčitelném, presymptomatickém stádiu.
- Systémy, které poskytnou ocenění terapeutické a chirurgické účinnosti v reálném čase pro urychlení klinického postupu
- Multifunkční, na cíl zaměřená zařízení, schopná dodávat terapeutické látky s vysokou lokální koncentrací přímo do rakovinných buněk a těch tkání v okolním mikroprostředí, které mají kritický význam při růstu rakovinných buněk a metastáz, a obejítím biologických bariér.
- Látky schopné monitorovat a předpovídat molekulární změny v buňkách a zajistit, aby se buňky v předrakovinném stádiu nestaly maligní.
- Pozorovací systémy, které budou detekovat mutace, které mohou spouštět rakovinný proces a detekovat genetické markery indukující sklon k rakovině.
- Nové metody řízení symptomů rakoviny, které zhoršují kvalitu života.
- Výzkumné nástroje, které umožní výzkumníkům rychle identifikovat nové receptory (targety) pro klinický vývoj a predikci rezistence léků

CNP se zaměřuje na 6 oblastí, o kterých se soudí, že nanotechnologie budou mít největší a nejrychlejší účinek:

- Molekulární zobrazování a ranná detekce
- Zobrazování *in vivo*
- Informační způsoby o účinnosti terapie
- Multifunkční terapeutika
- Prevence a ovládání rakoviny
- Zařízení a nástroje pro výzkum

CNP počítá s vytvářením center excelence, vybudováním Laboratoře charakterizace nanotechnologií, budováním řešitelských interdisciplinárních týmů a nanotechnologických platforem za účasti soukromého sektoru. V rámci programu se počítá s výzkumem toxicity nanočástic a vlivu na životní prostředí.

### 5.5.4.4. Současný přínos nanotechnologií v léčbě rakoviny

Klinický výzkum v oblasti nanotechnologií vztahující se k rakovině dnes pokračuje ve dvou hlavních liniích: v diagnostice vycházející z laboratorní analýzy a v diagnostických zobrazovacích metodách a terapiích *in vivo*. Pro ilustraci uvádíme několik nejdůležitějších údajů týkajících se vývoje v těchto oblastech, kdy s použitím nanotechnologií můžeme rozšířit naše chápání buněčné a molekulární biologie v oblasti rakoviny.

---

<sup>407</sup> [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov).

### **Nanotechnologie a molekulární zobrazování**

- Nanodráty o průměru 1 – 2 nm umístěné na mikrometrické křemíkové mřížce mohou být povlakovány monoklonálními protilátkami, které jsou nasměrovány proti různým markerům tumorů, což vede k stokrát větší citlivosti metody, ve srovnání se současnými jiným diagnostickými technikami. Tato metoda navíc vyžaduje minimální přípravu vzorku.
- S použitím nanometrické „laboratoře na čipu“ je nyní možné provést analýzu jednotlivých biochemických markerů v reálném čase
- Pro označení a sledování mnoha jednotlivých molekul uvnitř buněk byly použity kvantové tečky, čímž se získala možnost studovat biochemické a genetické systémy, jejichž činnost se při rakovině zhroutí.

### **Nanotechnologie a techniky zobrazování *in vivo***

- Nanometrické kontrastní látky pro MRI, které obsahují superparamagnetické nanočástice železa, mimořádně zlepšují schopnost detekovat metastatické léze v mízních uzlinách, jež doprovázejí rakovinu prsu a prostaty.
- Nanočástice zlata demonstrují užitečnost kontrastních látek u endoskopického optického zobrazování specifických molekulárních markerů rakoviny *in vivo*.
- Ukázalo se, že nanočástice lipidů naplněné plynem mají naději být použity jako akusticky aktivovaná čidla pro zobrazování a rovněž snad i jako systémy pro cílenou dodávku léků do organismu u tumorů s prostorovým rozlišením od 0,5 do 1 milimetru, přičemž by bylo získáno několik snímků za vteřinu.
- Nanočástice pokryté zlatem a konjugované her-2 (receptor epidermálního /pokožkového/ růstového faktoru) s dielektrickým křemíkovým jádrem umí identifikovat buňky karcinomu prsu *in vivo*. Jakmile se tyto nanočástice navázaly na své cílové buňky, měly sklon k většímu optickému výkonu, čímž se proměnily v nanometrické tepelné skalpely, které dosahují teplot, při nichž rakovinné buňky zanikají.

### **Nanotechnologie a léčba rakoviny**

- Ukazuje se, že lze využít širokou škálu syntetických nanočástic, které jsou zacíleny do nádorových buněk, vstoupí do nich a uvolní v nich terapeutika.
- Zkonstruované částice virů mohou sloužit jako multifunkční, zacílená neimunogenní nanometrická zařízení, která mají široký okruh aplikací *in vivo*.
- Fotosenzitizéry používané ve fotodynamické léčbě, v níž je světlo využíváno lokálně uvnitř tumorů k výrobě reaktivního kyslíku, byly rovněž zakomponovány do cílených nanometrických zařízení. Dalším krokem, který navazuje v této práci, je rovněž začlenění systému vyrábějícího světlo, což je například pár luciferin – luciferáza, a to takovým způsobem, který by spustil výrobu světla pouze poté, co by nanočástice byly zachyceny cílovou buňkou. Kdyby se to podařilo, tak taková metoda by velmi rozšířila možnosti využití fotodynamické léčby, která by pak zahrnovala léčbu nádorů hluboko uvnitř těla.

### **Nanotechnologie jako metoda, která usnadňuje výzkum**

- Vytváření a testování nanoplateform může v buněčné biologii pomoci zdokonalit laboratorní testy na čipu. Tyto nanoplateformy lze konstruovat tak, aby přesně imitovaly okolní mikroprostředí, ve kterém určitá buňka normálně vyrůstá, přičemž je vyvinut systém schopný nejen rozrušit buňky, ale i zaznamenat jejich reakce o tom,

jak se buňky chovají v těle, a to daleko názornějším způsobem než je pozorováno u buněk, které vyrůstaly ve standardních systémech pro kultivace tkání.

- Nanometrické zařízení může analyzovat složitý genom a ukazuje se, že lze rozlišit tumory v raném stádiu, které vyjadřují podobné fenotypy, a to na základě toho, že každý tumor si vybírá lehce odlišný způsob, jak způsobit poruchu ve svém genomu.

#### **5.5.4.5. Možnosti, které vyplývají ze zásadního porozumění rakovinným procesům<sup>408</sup>**

Nanotechnologie nabízejí celou škálu nástrojů od nanometrických laboratoří na čipu, které umí monitorovat a manipulovat s jednotlivými buňkami, až po nanosondy, které umí vystopovat nejen pohyb buněk, ale i jednotlivých molekul tak, jak se pohybují ve svém prostředí. S využitím těchto nástrojů biologové, kteří se zabývají rakovinou, mohou studovat, monitorovat i měnit rozmanité systémy, u nichž došlo v průběhu rakovinného procesu ke zhroucení jejich činnosti, a také identifikovat klíčová biochemická a genetická „úzká místa“, kam by mohly být nastupující metody molekulární terapie nasměrovány nejlépe. Jako taková může nanotechnologie sloužit jako perfektní doplněk jiných technologických platforem, například proteomiky a bioinformatiky, které jsou považovány za zásadní stimuly při objevování a vývoji, podporující krátkodobý i dlouhodobý pokrok v prevenci rakoviny, její diagnóze a léčbě. Důležitější však je, že nanotechnologie mohou posloužit jako všestranná vývojová platforma, která pomůže rychleji přeměnit průniky do podstaty věcí v biologii na produkty, které jsou užitečné pro lékařskou praxi.

Před třiceti lety byla rakovina obvykle smrtelnou chorobou, o níž bylo málo známo. To už neplatí. Dnes víme, že se buňka stává maligní v důsledku změn v jejím genetickém materiálu a že doprovodná biologická charakteristika buňky může rovněž změnit posloupnost kroků, u kterých může trvat léta, než dojdou do stádia, ve kterém se buňka stává maligní a vyvíjí se v nádor. Tyto změny představují jedinečné molekulární „signatury“ a slouží jako signály přítomnosti rakoviny a také jako známka předrakovinných buněčných stavů. Tento hlubší vhled do genetických změn, které se vyskytují uvnitř rakovinné buňky, měl vliv na změnu průběhu výzkumu rakoviny a vedl k podpoře nových metod v prevenci rakoviny, její detekci, diagnóze a léčbě.

Rakovinná buňka je však pouze částí celého procesu vývoje rakoviny. Jak rakovinná buňka roste uvnitř spletené struktury tkání a orgánů v těle, dochází i k její interakci s okolním prostředím. Stále více se nyní potvrzuje, že dochází k dynamické interakci mezi rakovinnou buňkou a jejím lokálním a systémovým mikroprostředím, přičemž navzájem hluboce ovlivňují svoje chování. Toto „mikroprostředí nádoru“ je obydleno různými typy buněk, je bohaté na růstové faktory a enzymy a obsahuje části krve a lymfatických systémů. Toto prostředí tímto podporuje některé z nejdestruktivnějších charakteristik rakovinných buněk a umožňuje růst a šíření tumoru. Vzhledem k tomu, že nanometrické přístroje jsou konstruovány pro multifunkční účely, nabízejí možnost řídit tyto složité interakce způsobem, který by mohl zastavit růst a šíření rakoviny.

Mikroprostředí by rovněž mělo mít vliv na přístup terapeutických prostředků k nádorovým buňkám, na to, jak tělo tato léčiva zpracuje a jak si vyvine rezistenci vůči léčbě rakoviny. To jsou problémy, které by však nanometrické přístroje měly umět v budoucnu zvládat. I když buňky v tomto mikroprostředí nemusí být geneticky změněny, jejich chování lze změnit prostřednictvím interakcí s buňkami tumoru. Lékaři si nyní, když léčí pacienta, uvědomují, že

---

<sup>408</sup> Cancer Nanotechnology Plan, 7/2004, str. 25.

čelí nádorovému tělesu, které se skládá ze zhoubných buněk v kombinaci s jejich hostitelským nádorovým prostředím. Nádorové buňky a jejich okolní prostředí musí být dobře charakterizovány, abychom pochopili, jak rakovina v těle bují a při vývoji nových intervenčních postupů proti rakovině musí být zvažovány oba tyto faktory.

Nyní chápeme, že rakovina je kulminací mnoha biochemických a genetických procesů, u kterých v maligní buňce a v jejím okolí došlo ke zvrácení činnosti a že to není jedna jediná změna, která způsobí, že se buňka stává zhoubnou. Proto nyní nahlížíme na rakovinu jako na onemocnění systémů, které zahrnuje interakce mnoha buněčných procesů. Změny, které tyto procesy nepříznivě ovlivňují, spadají do několika obsáhlých kategorií, které lze charakterizovat následovně:

#### 5.5.4.5.1. Rakovinné buňky dospívají k soběstačnosti v růstových signálech

Buňky rostou a množí se v reakci na širokou škálu růstových signálů, které spouštějí celou sérii řízených biochemických a genetických jevů. V normálním buněčném prostředí je produkce těchto růstových signálů pevně kontrolována, ale zhoubné buňky si vyvinuly mnoho způsobů, jak buď vyrábět své vlastní růstové signály nebo jak zkratovat kontrolní mechanismy, které jsou s těmito růstovými signály spojeny. Mnoho látek podněcujících nádorové bujení, které byly dodnes objeveny, dává rakovinným buňkám schopnost imitovat normální procesy signalizace růstu. Vzhledem k různorodé povaze činnosti růstového faktoru může být nutné doručit několik činidel cíleně do molekul tumoru s cílem kontrolovat jeho růst, což je úkol, pro který se nanometrická zařízení ideálně hodí.

#### 5.5.4.5.2. Rakovinné buňky se stávají necitlivými vůči signálům proti růstu

Normální buněčné prostředí rovněž produkuje četné signály proti růstu, které působí jako kontrola pro neregulovanou reprodukci buněk. Tyto signály kontrolující růst přicházejí zejména ze sousedních buněk a z mimobuněčné matrice a rovněž spouštějí sérii řízených biochemických a genetických jevů, které regulují buněčný cyklus. Naše současné chápání těchto systémů je takové, že tyto signály přicházejí přes tři úzce provázané receptory na povrchu buňky a že rakovinné buňky jsou schopny narušit tyto receptory nebo přímo systémy, které tyto receptory řídí. Díky víceúčelové podstatě nanometrických zařízení se zde opět nabízí možnost interakce s více než jedním z těchto receptorů současně.

#### 5.5.4.5.3. Rakovinné buňky se vyhýbají apoptóze

Třetím mechanismem, jak regulovat nepatřičný růst buněk, je apoptóza, která představuje soubor naprogramovaných buněčných procesů, jejichž výsledkem je smrt buňky. Z mnoha výzkumných studií je zřejmé, že rakovinné buňky získávají schopnost se apoptóze vyhnout a že úspěšná léčba rakoviny umí spustit reaktivní apoptózu v maligních buňkách. Zařízení buňky, které vyvolává apoptózu, se skládá ze senzorů, jež monitorují vnitřní a vnější stav buňky a její prostředí a z efektorů, které spouštějí apoptózu, jakmile senzory zjistí abnormální podmínky. Ztráta proteinu p53, který je charakteristický pro polovinu všech typů rakovin, umožňuje buňkám se apoptóze vyhnout. Zdá se však, že rakovinné buňky s poškozenými systémy pro apoptózu mohou mít nepotřebné přebytečné, i když neaktivní mechanismy, které apoptózu vyvolávají. Nanometrická zařízení budou velmi potřebná z důvodu zjišťování, zda dochází opět k apoptóze, což je znakem toho, že léčba rakoviny funguje.

#### 5.5.4.5.4. Rakovinné buňky získávají nekonečný potenciál ke své reprodukci

Telomery<sup>409</sup> představují čtvrtý mechanismus, který může kontrolovat neomezený buněčný růst, jenž je pro rakovinu charakteristický. Pokaždé, když se buňka reprodukuje normálním způsobem, její chromozomy nezvládají plně reprodukovat telomery, a když telomery dosáhnou stanovené zkrácené délky, začínají se chromozomy slučovat, čímž dochází ke spuštění apoptózy. Telomery tak působí jako „počítač pro reprodukci“, který limituje buňku v její možnosti být nesmrtelná. Nějakých 85 až 90 procent všech rakovinných buněk si vyvine schopnost ke spuštění exprese telomerázy, což je enzym, který umí udržet normální délku telomeru a který je téměř ve všech normálních buňkách silně potlačen. Zbývajících 10 až 15 procent rakovinných buněk si vyvine mechanismus, který udržuje délku telomeru po dobu výměny sekvence chromozom – chromozom. Vzhledem ke své schopnosti doručovat látky do specifických buněk a možná i do organel uvnitř buněk, mohou nanočástice představovat technologickou platformu nezbytnou pro terapeutické a preventivní látky, které by mohly do procesu zasahovat.

#### 5.5.4.5.5. Rakovinné buňky spouští trvalou angiogenezi

Všechny tuhé tumory si vyvinou schopnost spustit angiogenezi s cílem zajistit si kyslík a živiny. Vznikající nádory nespouštějí angiogenezi okamžitě, ale v nějakém momentu jsou schopny změnit rovnováhu mezi angiogenickými a antiangiogenickými faktory ve prospěch růstu kapilár, a to v mnohastupňovém procesu, který je možné obrátit. Poslední výzkumy na modelech myši ukázaly, že různé antiangiogenické faktory jsou účinné v přerušení angiogeneze a vyhladovění tumorů v určitých specifických fázích angiogeneze a nádorového růstu. Je také zřejmé, že různé typy nádorových buněk používají pozoruhodné molekulární strategie k tomu, aby vyvolaly angiogenezi. Nanometrická zařízení schopná angiogenezi zobrazit, by mohla představovat novou technologii pro včasné zjištění nádorů; víceúčelová nanometrická zařízení budou schopna doručit mnohé inhibitory angiogeneze současně.

#### 5.5.4.5.6. Rakovinné buňky metastázuji a napadají další tkáň

Téměř 90 procent všech rakovin končících smrtí je výsledkem šíření metastáz z primárního tumoru. V určitém momentu svého vývoje si nějaké množství zhoubných buněk vyvine schopnost se odloučit od hmoty primárního tumoru, napadne sousední tkáň a rozšíří se do různých míst po celém těle. Je jasné, že invaze buněk a šíření metastáz vyplývají z řady složitých biochemických a genetických jevů, které nepříznivě ovlivňují četné systémy jak v metastatické buňce, tak i v tkáních, které jsou napadeny. Ačkoli většina těchto jevů je ještě chabě prozkoumána a charakterizována, poslední práce ukázaly, že u molekulárních systémů, které se účastní udržování normálního kontaktu se sousedními buňkami, dojde před tím, než začnou metastázy, ke změnám. Metastatické buňky kromě toho zahájí expresi proteáz, které jsou schopny znehodnotit extracelulární matrix. Nanometrická zařízení pro analýzu mohou umět detekovat časně molekulární signatury metastáz ještě předtím, než lze zjistit jinými prostředky druhé tumory.

#### 5.5.4.5.7. Genomy rakovinných buněk se stávají nestabilní

Není téměř pochyb, že většina ze šesti výše uvedených molekulárních charakteristik rakovinných buněk, které byly jmenovány výše, vyplývá z genetických změn v rakovinné buňce, ale dosažení mnohačetných mutací prostřednictvím náhodných procesů je nepravděpodobné vzhledem k ohromnému úsilí, které buňky vynaloží k udržení integrity

---

<sup>409</sup> **Telomera** – struktura na konci chromozomu spojená s charakteristickou sekvencí DNA, která je replikována zvláštním způsobem.

svých genomů. Rakovinné buňky však přesto akumulují potřebné mutace, které jsou nutné ke změně z normálního stavu do prekancerózního a z prekancerózního do zhoubného, což naznačuje, že rakovinné buňky musí mít rovněž genomy, které jsou nepřírodně nestabilní; poslední výzkum opravdu ukázal, že maligní buňky vskutku mají hrubě přeskupené genomy včetně četných kopií specifických chromozomů. Kromě toho tento výzkum ukázal, že buňky mohou nabýt jedné nebo více výše zmíněných charakteristických črt, ale nestanou se rakovinnými, dokud jejich genomy nebudou vykazovat takovou nestabilitu. V současné době se vyvíjejí nanometrické přístroje, které budou umět detekovat genetické mutace a nestabilitu genomu.

## 6. ZÁVĚR

V průběhu 20. století se rozvoj vědy a techniky velmi zrychlil a zintensivnil. V jeho druhé polovině jsme pozorovali zřetelné vydělení třech technologických oblastí, které se současně začínají postupně prorůstat. Jsou to informační a komunikační technologie, moderní biotechnologie a biomedicína a nanotechnologie. Jejich rozvoj v posledních čtyřiceti - padesáti letech nenastal současně. Zatím co nové aktivity v informačních a komunikačních technologiích začaly být zřetelné od šedesátých let minulého století (osobní a přenosné počítače, internet, mobilní telefony, e-mail, MEMS aj.), biotechnologie zaznamenaly svoji modernizaci od osmdesátých let minulého století (genové inženýrství, počátky klonování). Nanotechnologie, které si kladou za cíl setření hranice mezi přírodními a lidmi vytvářenými molekulárními systémy, se intenzivně začaly rozvíjet na přelomu tisíciletí.

Předpokládá se, že konvergence věd, které stojí za uvedenými technologiemi, včetně propojení s kognitivními vědami, může způsobit novou renesanci vědění, vyjadřující holistický pohled na technologie založené na transformaci nástrojů, matematice komplexních systémů a porozumění příčinných souvislostí fyzikálního světa od nanorozměrů k vesmírným dimenzím<sup>410</sup>.

Postupující konvergence věd se potýká s různými problémy, většinou spojenými s lidským faktorem:

- Odpor vůči novým technologiím. Dějiny naznačují, že odpor je konstantním rysem dějin inovace a technologických změn. Odpor musí být chápán ve smyslu interakce mezi technologií a jejím sociálním kontextem. Na odpor je však třeba pohlížet jako na kladnou část sociálního procesu výběru a nevidět v něm překážku technologického procesu.
- Rozdíly mezi vědními disciplinami. Mezi vědními disciplinami lze v současné době nalézt několik podstatných rozdílů, které brání v jejich konvergenci a spolupráci odborníků. Za příklad si vezmeme rozdíly mezi vědami o živé přírodě a naukou o materiálech zjištěné při prognostické studii<sup>411</sup>:
  - Zástupci obou oblastí používají různý odborný žargon
  - U zástupců obou oblastí byl pozorován různý způsob myšlení, jiné normy a hodnotové stupnice.

<sup>410</sup> „Converging Technologies for Improving Human Performance“, NSF/DOC report, ed. by M.C.Roco, W.S.Bainbridge, 6/2002, Arlington, VA., str. x.

„Konvergující technologie – utváření budoucnosti evropské společnosti“, vyd. Repronis Ostrava, 10/2005, ISBN80-7329-103-7.

<sup>411</sup> De Goot R., Loeffler J., Sutter U. „Roadmap Report Concerning the Use of Nanomaterials in the Medical & Health Sector“, zpráva projektu FP6 „NanoroadSME“, 3/2006, str. 98, [www.nanoroad.net](http://www.nanoroad.net)



- Způsob výzkumné práce je odlišný a zástupci obou oborů se neorientují v nástrojích a metodách druhého oboru.
- Rozdíly ve vzdělání mezi techniky a biology<sup>412</sup>. Biologie je velmi specifický obor, zatímco technické vědy patří mezi oblasti, v nichž mohou být odvozena všeobecná pravidla a následně aplikována v širším kontextu. Ohromná složitost biologie obvykle biology nutí k tomu, aby se specializovali a možná si například vybudovali svou kariéru na výzkumu určitých makromolekul (specifických enzymů, růstových faktorů, genetických prvků apod.) nebo biologických systémů. Biologové se často považují za nenahraditelné a velmi neochotně odstupují od svého základního výzkumu, aby se zaměřili na nové oblasti. Pro mnoho biologů představuje tato činnost velké podnikání a významné riziko. Na druhé straně inženýři se často považují za ty, kteří vycházejí z prvních principů a jsou více (ne-li naprosto) ochotni vkročit do nových oblastí. Přecházení z jednoho vědního oboru do druhého je koneckonců daleko snazší pro inženýry, kteří pracují ve fyzikálních vědách, zatímco pro biology je to mnohem obtížnější nejen z důvodu výchovy, ale i z hlediska výše zmíněné reality v biologii. Inženýři naopak z důvodu svého výcviku a na základě svých zkušeností často příliš podceňují složitost biologických systémů a někdy se chovají takovým způsobem, který biologové považují za naivní v přístupu k biologickým systémům. Naneštěstí nebo naštěstí, to záleží na úhlu pohledu, vyžadují nanometrické lékařské přístroje jak expertízu z hlediska inženýrství, tak i biologie. Často nyní dochází na akademické půdě k debatám v biolékařském inženýrství a dalších příbuzných oborech o tom, jak nejlépe připravit studenty pro praxi v této mimořádně problémové oblasti.
- Tradiční organizační bariéry: V průběhu desetiletí došlo k rozsáhlé specializaci a vzniku množství vědních oborů a podoborů. To se promítá do stávající struktury vysokých škol i jejich vnitřní struktury, do zaměření výzkumných pracovišť (viz např. Česká akademie věd) i do struktury některých výzkumných programů (např. v 6. Rámcovém programu EU se nacházejí vědy o živé přírodě, informatika a nanotechnologie v různých tematických prioritách). Je třeba poznamenat, že v některých státech je snaha tuto situaci změnit různými způsoby (USA, EU – 7. RP, aj.). I v České republice se v poslední době zakládají interdisciplinárně zaměřené programy (Nanotechnologie pro společnost, NPV II).

Předložená publikace je malým příspěvkem k řešení současné výše uvedené situace. Je psána techniky především pro techniky a studenty technických škol a lze doufat, že alespoň minimálně přispěje ke sblížení dvou konvergujících oborů – biotechnologie a nanotechnologie.

[www.nanotechnologie.cz](http://www.nanotechnologie.cz)

---

<sup>412</sup> Lee S.C. et al „Therapeutic Nanodevices“, v „Springer Handbook of Nano-technology“, vyd. B.Bhusan, Spinger, 2004, str. 316, ISBN 3-540-01218-4.