

VYUŽITÍ NANOTECHNOLOGIÍ V MEDICÍNĚ

Autor: David Klepárník

Školitel: prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Ústav lékařské biofyziky

Úvod:

Nanočástice jsou chápány jako objekty, jejichž rozměry jsou menší než 100 nm, to je 100×10^{-9} m. Pro představu červená krvinka má rozměry zhruba 7000 nm. Takové látky nejsou postřehnutelné pouhým okem. Nanočástice mohou být jakékoliv látky od shluků atomů jednoho prvku až po makromolekuly. Nanotechnologie se využívají v širokém spektru odvětví, například ve fyzice, chemii, biologii, optice a elektronice [1].

Využití v medicíně

Nanotechnologie našly široké možnosti využití v lékařství. Zkoumá se využití nanočástic, které by umožnily přesné doručování léčiv, jako například chemoterapeutik pouze do rakovinových buněk. Tímto problémem se zabývá například firma CytImmune a již publikovala výsledky prvních testů.

Jako „nanohouby“ jsou nazývány objekty, které jsou schopny pohlcovat množství různých toxinů nebo i kyslíkových radikálů, které působí škodlivě na buňky. Výzkumníci Georgia State University vyvíjí vakcínu, která by byla účinná proti všem typům chřipky. Tato vakcína by pomocí nanočástic napadala část viru, která je shodná pro všechny kmeny chřipky.

Zaměstnanci Wyss Institute zkoumají nanočástice, které by uvolnily léčivo v případě zvětšeného okolního tlaku. Tímto způsobem by bylo možné léčit například trombotické stavy. První laboratorní testy na zvířatech měly pozitivní výsledky.

V poslední době je zajímavým tématem vývoj obalů léčiv, které by umožnily projít skrz intestinální trakt bez poškození. Tímto způsobem by bylo možné podávat léky, který by normálně bylo nutné podat injekčně, *per os* [2].

Nanočástice stříbra

Stříbro jako prvek má v nanotechnologiích velké využití. Zvláště antimikrobiální vlastnosti nanočástic stříbra jsou momentálně intenzivně zkoumány a již je na trhu obrovské množství produktů, od ponožek, přes obvazy až po chirurgické nitě. Nanočástice stříbra mají i protizánětlivé účinky.

Účinky stříbra na živé organismy

Nanočástice stříbra působí podobně na bakterie a běžné buňky, leč v něčem se liší.

Buňky ovlivňují jak atomy stříbra, tak i stříbrné ionty. Vlivy nanočástic stříbra jsou různé. Nanočástice jsou schopné interagovat s membránovými proteiny a tímto způsobem aktivovat různé signální kaskády, které mohou vést k zastavení buněčného dělení. Nanočástice se mohou do buňky dostat prostou difúzí nebo endocytózou. Uvnitř buňky mohou poškozovat mitochondrie, tvořit kyslíkové radikály (ROS) a uvolňovat stříbrné ionty.

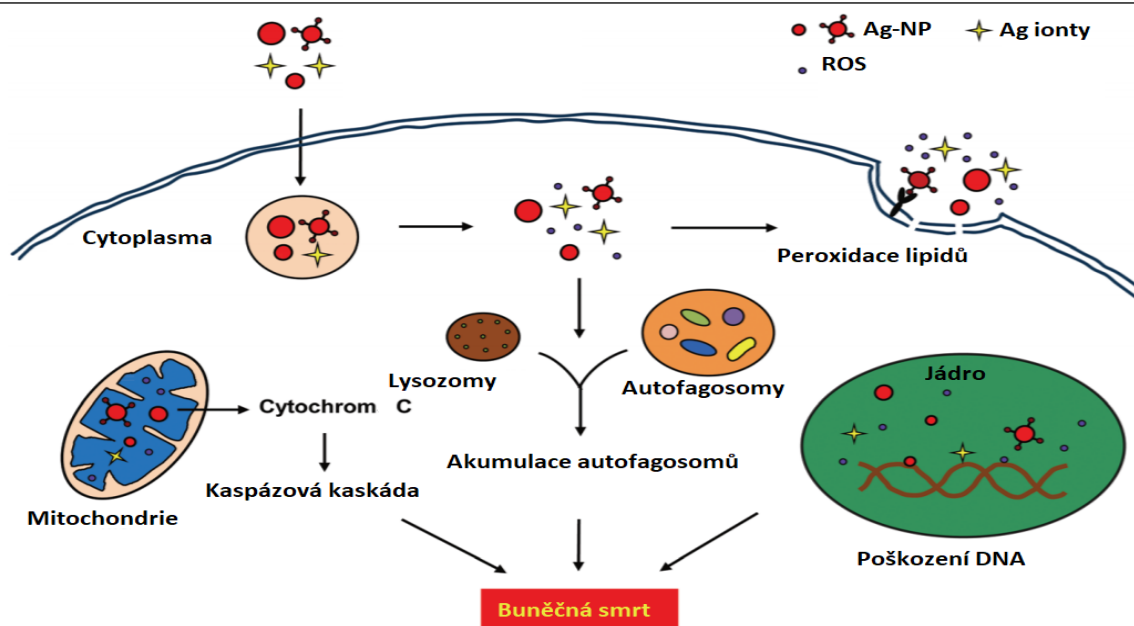
Nanočástice stříbra se akumulují okolo mitochondrií a způsobují jak přímé poškození těchto organel, tak i narušují dýchací řetězec. Poškození dýchacího řetězce vede ke vzniku dalších ROS a omezení tvorby ATP. Oba tyto mechanismy vedou k poškození DNA.

Poškození buněk kyslíkovými radikály je založeno na vysoké reaktivitě těchto částic. V těle vznikají i za fyziologických podmínek. Proti těmto škodlivým účinkům existuje celá řada obraných mechanismů. Předně je potřeba zmínit sloučeniny známe jako antioxidanty. Zvýšený výskyt ROS je označován jako oxidační stres.

Nanočástice stříbra i stříbrné ionty mohou interagovat s molekulami, jež obsahují síru díky velké afinitě stříbra k síře. Síra je součástí velkého množství makromolekul, jako jsou proteiny a enzymy, a tímto způsobem může dojít k poškození funkce těchto molekul. Nanočástice též přímo interagují s DNA molekulami a způsobují tak apoptózu [3].

Obr. 1: Působení Ag na buňky

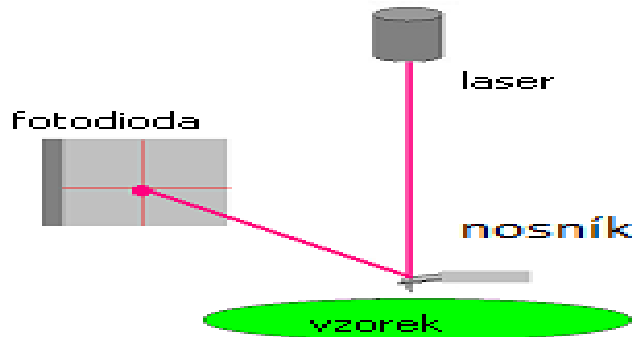
Zdroj: Wang Z, Xia T, Liu S. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects. *Nanoscale*. 2015;7(17):7470-7481. doi:10.1039/c5nr01133g.



Nanočástice stříbra působí na bakterie velmi podobně, ale s tím rozdílem, že bakterie mají buněčnou stěnu, kterou mohou též napadat stříbrné nanočástice. Antimikrobiální aktivita stříbra spočívá v schopnosti tvořit kyslíkové radikály a v ukotvení do bakteriální stěny. Nanočástice se zakotvují v buněčné stěně bakterií, tvoří póry a buněčná stěna se stává prostupnější. Zvýšená propustnost stěny vede ke smrti bakterie. Kyslíkové radikály (ROS) napadají stěnu gram-negativních i gram-positivních bakterií. Stěna je po poškození ROS propustnější a nakonec dochází též ke smrti bakterie. Bakterie na rozdíl od běžných buněk nedisponují tak rozsáhlým arzenálem, kterým by mohly bojovat proti kyslíkovým radikálům. Z tohoto důvodu jsou na poškození kyslíkovými radikály náchylnější než běžné buňky.

AFM

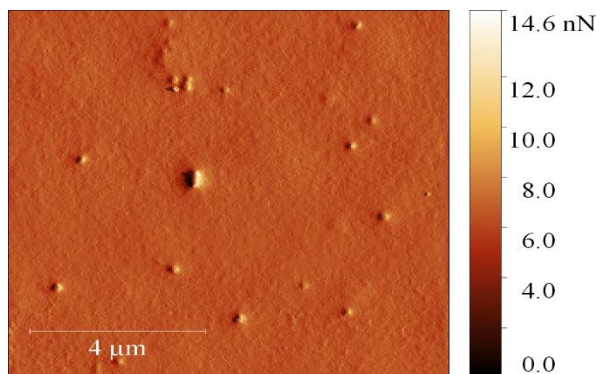
AFM (atomic force microscopy), česky mikroskopie atomárních sil je mikroskopická technika, která se používá k trojrozměrnému zobrazení povrchů a k určení velikost nanočástic. Princip AFM je založen na působení van der Waalsových přitažlivých sil a na působení Pauliho odpuzivých sil. Síly van der Waalsovy se řadí mezi slabé vazebné interakce. Jsou trojího typu a to indukční, disperzní a coulombické. Vznikají v nepolárních molekulách, které nemají stálý dipól a jejichž vazby nejsou polarizované.



Obr. 2: Schéma AFM

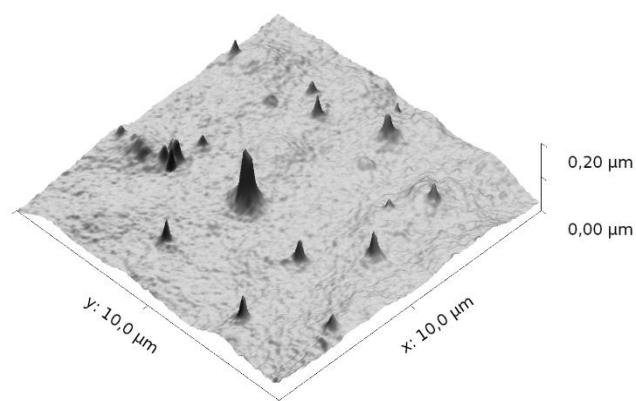
Zdroj: Anonymus – (30. 3. 2018), dostupné z <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AFM.PNG>

Konstrukce AFM se skládá z laseru a nosníku, na kterém je umístěn hrot. Nosník s hrotem se pohybuje po řádcích nad zkoumaným materiálem, který je nanesen na mikroskopické sklíčko. Jak se hrot pohybuje nad povrchem, vzorku dochází k jeho přiblížování (působením přitažlivých van der Waalsových sil) nebo k oddálení (působením Pauliho odpuzivých sil). Tato změna polohy hrotu se projeví ohnutím nosníku. Změna tvaru nosníku je zaznamenána tak, že dopadající paprsek laseru se odrazí pod jiným úhlem a i paprsek nakonec dopadne na jiné místo detektoru. Ohnutí paprsku je následně převedeno na digitální obraz. Někdy se tomuto principu říká „laserová páka“. Metoda AFM má široké uplatnění a je také vhodná k zobrazení nanočástic, určení jejich tvaru a stanovení velikosti.



Obr. 3: Snímek peak force error z AFM

Zdroj: vlastní



Obr.4: 3 D zobrazení z AFM

Zdroj: vlastní

Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda, která je založena na změně absorbance vzorku. Veliké množství látek, ať už se jedná o atomy nebo celé molekuly, je schopno absorbovat (pohltit) část monochromatického světla, které prochází vzorkem. Spektrofotometry jsou schopny určit jaké množství světla bylo pohlceno. Látky se liší tzv. absorpčním maximem. Jedná se vlnovou délku (λ), při které je absorbováno největší množství světla. U zkoumané látky je vhodné stanovit absorpční maximum, protože mnoho jiných analytických metod je založeno právě na spektrofotometrii (např. MTT test) a využívá absorbance látek. Pokud by bylo absorpční maximum zkoumané látky a látky, kterou používám v daném typu testu k určení vlastnosti, stejné, mohlo by dojít k negativnímu zkreslení výsledků. Pomocí spektrofotometrie je možné stanovit také koncentraci dané látky v roztoku. Spektrofotometrie je také vhodná k charakterizaci nanočástic, protože je patrná závislost jejich velikosti na absorpčním maximu. S rostoucí velikostí nanočástic roste i absorpční maximum [4].

MTT test

MTT test je metoda, pomocí které se hodnotí metabolická aktivita buněk nebo cytotoxicita dané látky. Princip metody spočívá v kolorimetrii, tedy ve sledování změn zabarvení vzorku. Buněčné oxidoreduktázy (typ enzymu) jsou schopny za určitých podmínek redukovat žluté tetrazoliové barvivo MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid) na nerozpustný formazan, který je fialový. Tato reakce probíhá pouze v cytosolu živých metabolicky aktivních buněk. Tento jev (přeměna MTT na formazan) popisuje, kolik buněk je aktivních (živých) a lze jej využít ke stanovení cytotoxicity určitých látek, jako například nanočástic stříbra. Barevná změna se stanovuje spektrofotometricky za využití vlnových délek okolo 570 nm. Sleduje se změna absorbance vzorku. Čím je daný typ buněk metabolicky

aktivnější, tím více barviva se přemění. Krom MTT existují i jiná podobná barviva, u kterých se též sleduje barevná změna, např. MTS, WSTs, a XTT. U této metody se též stanovuje koncentrace dané látky, při které zahynulo 50 % buněk. Této koncentraci se říká IC₅₀. U této metody je přínosné zachovat co možná největší pečlivost a sterilitu prostředí, protože při nedodržení správného pracovního postupu může dojít ke kontaminaci vzorků a následnému zkreslení výsledků testu. Důležité je buňky uchovat ve vhodném prostředí, aby nedošlo např. k vyschnutí či spotřebě média, ve kterém buňky přežívají.

Závěr

Nanotechnologie skýtají obrovské příležitosti pro využití v medicíně. Mohou být využity jako nové typy léčiv, například se uvažuje o náhradě antibiotik nanočásticemi stříbra. Nanotechnologie mohou být velmi přínosné v medicíně, ale je stále velmi nutné a aktuální, aby byly zkoumány i negativní a potenciálně škodlivé vlivy na organismus.

Zdroje:

1. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*. 2007;2(2):129-141.
2. Anonymus-Nanotechnology in Medicine – Nanomedicine (30. 3. 2018), dostupné z <http://www.understandingnano.com/medicine.html>
3. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *Journal of food and drug analysis*. 2014;22(1):116-127. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.010.
4. Anonymus- Silver Nanoparticle Properties – Cytodiagnosics, (30. 3. 2018), dostupné z <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Silver-Nanoparticle-Properties-d11.htm>.

Seznam obrázků:

Obrázek č. 1: Působení Ag na buňky, zdroj: Wang Z, Xia T, Liu S. *Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects*. *Nanoscale*. 2015;7(17):7470-7481. doi:10.1039/c5nr01133g.

Obrázek č. 2 Schéma AFM, zdroj: Anonymus – (30. 3. 2018), dostupné z <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AFM.PNG>

Obrázek č. 3: Snímek nanočástic z AFM, zdroj: vlastní

Obrázek č. 4: 3 D zobrazení z AFM, zdroj: vlastní