

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Barbora Číhařová

Význam velikosti a geometrie nanočástic na jejich internalizaci buňkou

Influence of size and geometry of nanoparticles on cellular internalization pathways

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 10.5.2018

.....

Barbora Číhařová

Ráda bych poděkovala své školitelce, paní doktorce Haně Španielové, za obrovskou trpělivost, čas a nespočet cenných rad, které mi při psaní této práce dávala. Děkuji také rodině a svým blízkým za veškerou podporu.

Abstrakt

Nanočástice mohou být v biomedicínských oborech využívány jako nosiče pro dopravu diagnostických a terapeutických látek do buněk. Experimentálně se využívají nanočástice různých tvarů, velikostí a různého složení. Navzdory objevům, kterých bylo již v této oblasti dosaženo, přesná povaha interakcí nanočástic s buňkou zatím není zcela pochopena. Cílem práce je poskytnout poznatky o možnostech využití a aspektech ovlivňujících interakci s buněčnou membránou u několika typů modelových nanočástic: u liposomů, u zlatých nanočástic a u viru podobných nanočástic. Ze srovnání vyplývá, že zobecnění buněčného vstupu pro různé typy nanočástic je problematické, ač se zdá, že obecně efektivnější vstup vykazují kulaté nanočástice s průměrem 50 nm.

Klíčová slova: nanočástice, geometrie, internalizace, membrána, virům podobné částice,

Abstract

Nanoparticles can be used in biomedical disciplines as carriers for transport of diagnostic as well as therapeutic substances into cells. Variety of different shapes, sizes and different compositions are used experimentally. Despite the discoveries already made in this area, the exact nature of the interaction between a nanoparticle and a cell has not been fully understood yet. The objective of this thesis is to provide the knowledge about possibilities of utilisation and aspects influencing the interaction between the cell membrane and several types of nanoparticles: liposomes, gold nanoparticles and virus-like nanoparticles. The comparison shows that generalisation of the mechanism of nanoparticle entry into the cell is problematic, although it seems that the spherical nanoparticles with the diameter of 50 nm provide the most efficient entry.

Key words: nanoparticle, geometry, internalization, membrane, virus-like particle

Seznam použitých zkratek

AuNP	nanočástice ze zlata
CPP	buňku penetrující peptid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
FA	kyselina listová
FR	folátový receptor
GSH	gluthation
HPV	lidský papilomavirus
Kb	kilobáze
LDS	liposomální doručovací systém
LUV	velký unilamelární vezikul
M β CD	methyl- β -cyklodextran
MLV	multilamelární vezikul
NLS	nukleární lokalizační systém
NP	nanočástice
PAA	polyakrylová kyselina
PC	proteinová korona
PEG	polyethylen glykol
pH	potenciál vodíku
RES	retikuloendoteliální systém
RME	endocytóza zprostředkovaná receptorem
RNA	ribonukleová kyselina
SUV	malý unilamelární vezikul
SV40	Simian virus 40

TEV	virus hepatitidy typu E
tHBcAg	jádrový antigen viru hepatitidy B
TMV	virus tabákové mozaiky
UVA	ultrafialové záření A
VLP	viru podobná částice

Obsah

1. ÚVOD	1
2. NANOČÁSTICE	2
3. VIRŮM PODOBNÉ NANOČÁSTICE	4
3.1. Využití VLPs	5
4. LIPOSOMY	6
4.1. Typy liposomů.....	6
4.2. Stavba liposomů	7
4.3. Využití liposomů	8
4.4. Modifikace povrchu	9
5. ZLATÉ NANOČÁSTICE	11
5.1. Funkcionalizace povrchu	13
5.2. Proteinová korona	13
5.3. Využití zlatých nanočástic.....	13
6. VSTUP NANOČÁSTIC DO BUNĚK	14
6.1. Endocytóza	15
6.1.1. Velikost a tvar nanočástic.....	18
6.1.2. Povrch a náboj nanočástic	22
6.1.3. Vazba receptor - ligand.....	23
6.1.4. Interakce nanočástic	24
6.1.5. Příjem měkkých struktur	24
6.1.6. Typ buněčné linie	24
6.2. Rozdílný vstup nanočástic a nákladu.....	25
7. ZÁVĚR	26
Seznam použité literatury	27

1. ÚVOD

Nanočástice se staly předmětem rozsáhlého výzkumu posledních let díky jejich rozsáhlé možnosti využití v lékařství, co by nosiči diagnostických či terapeutických látek.

Viry, jakožto přirozené nanočástice, byly miliony let evoluce optimalizovány k nejučinnější strategii pro jejich pomnožení v hostiteli. Tato optimalizace probíhala nepochybně i na úrovni velikosti a geometrie, což jsou parametry, které mohou být klíčové pro prvotní interakci s hostitelskou buňkou a ovlivňovat osud viru v buňce.

Nanočástice (NPs z anglického nanoparticles) podobných velikostí a tvarů jako jsou částice virové jsou již dnes experimentálně využívány v oblasti medicíny, ale i v kosmetickém nebo potravním průmyslu.

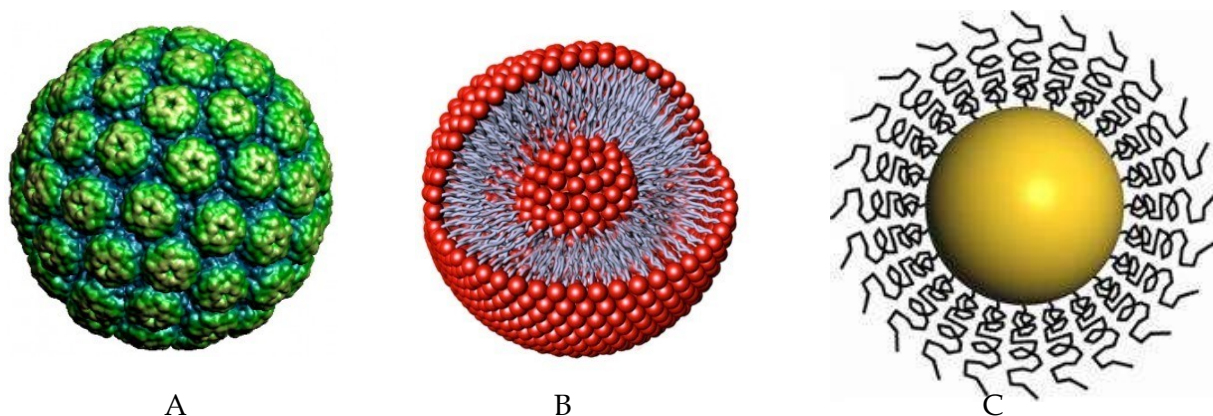
Bezprostředně po vstupu do organismu se NPs setkávají s přirozenými biologickými bariérami a k úspěšnému transportu materiálu do buňky musí překonat buněčnou membránu. Pro efektivní doručení látek do buněk je nezbytné chápat povahu interakcí mezi buňkou a nanočásticemi, které jsou pro účinný přenos terapeutik a diagnostických látek do buněk důležité. Ukazuje se, že velikost a geometrie částic jsou důležitými faktory, které ovlivňují způsob interakce s buňkou.

V této práci jsem se proto zaměřovala na dostupnou literaturu, která systematicky analyzovala vstup různých typů nanočástic do buněk v závislosti na jejich velikosti a tvaru s přihlédnutím k okolnostem, které mohou interakci s buňkou významně ovlivnit.

Dále jsou v této práci popsány viru podobné nanočástice, sestavené z virových strukturních proteinů, liposomy z lipidů, tedy pro buňku přirozených materiálů a zlaté nanočástice s ohledem na možnosti jejich využití.

2. NANOČÁSTICE

Složení a velikost jsou obecně prvními vlastnostmi, které charakterizují nanomateriály. Velikost nanočástic je udávána jako celkový průměr jádra a obalu a dle mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) jsou nanonanočástice definovány velikostí v rozmezí 1 až 100 nm. Vzhledem k tomu, že NPs jsou až trojrozměrné, dle normy musí být alespoň jeden rozměr v rozmezí 1 až 100 nm - příkladem mohou být NPs tvaru tyčinek s průměrem 10 nm, ale s délkou větší než 100 nm (Klaessig, 2017). Nanonanočástice lze rozdělit do kategorií na základě jejich morfologie, chemických a fyzikálních vlastností, podle kterých rozlišujeme nanočástice na bázi uhlíku, kovové zahrnující NPs alkalických a ušlechtilých kovů, jako je měď, stříbro nebo zlato, dále nanonanočástice založené na organických látkách, tedy polymerické nanonanočástice, nanočástice na bázi lipidů - liposomy a lipoplexy a v neposlední řadě také přirozené nanonanočástice - viry (Khan et al., 2017). Viru podobné částice, liposomy a zlaté nanonanočástice (na obrázku č. 1) budou více rozebrány a popsány s ohledem na jejich vlastnosti, jako je velikost a tvar (jak lze vidět v tabulce č. 1).



Obrázek č. 1 Nanočástice

A) Virům podobná nanočástice (Simian virus 40), B) Liposom, C) Zlatá nanočástice s polyvinylalkohol ligandy.

Převzato a upraveno z (Virology.sw; Sanna et al., 2014; Phys.Org)

Tyto nanočástice mohou nést léčivé látky, zároveň je chránit a cílit na tkáň nebo orgány, čímž je možné, zejména při dodávce chemoterapeutických látek, snížit vedlejší účinky. Cílení na specifické buněčné typy je obvykle zajištěno potažením povrchu nanočástic biopolymery nebo makromolekulami, které jsou konjugovány s ligandy vážícími se na komplementární receptory na dané buněčné membráně (Zhang et al., 2015).

NPs se do organismů mohou dostávat jednak cílenou aplikací ve formě léčiv a potravin, ale i očnými sliznicemi, dermální absorpcí nebo vdechnutím aerosolů nanočástic (Hošek, 2010).

Bezprostředně po vstupu do organismu se NPs setkávají jak s fyzickými, tak i biologickými bariérami. Například sérové proteiny v krvi mohou reagovat a být vystavovány na povrchu částic, tedy působit jako opsoniny, které iniciují fagocytózu. Nicméně výzkum postupuje a jsou vyvíjené aplikační vektory cílené do nádorů, u kterých je snižená pravděpodobnost opsonizace v krevním řečišti a následné vychytávání retikuloendoteliálním systémem (RES). Dle shrnutí provedeného v roce 2006 Paciottim, větší částice snáz aktivují komplement. Pro snížení pravděpodobnosti opsonizace a následného zachycení RES, jsou tedy vhodnější menší částice. Stejného efektu lze dosáhnout potažením povrchu nanočástic hydrofilními polymery (Paciotti et al., 2006). U biomedicínských aplikací musí částice projít buněčnou membránou, pro úspěšné podávání léků na bázi nanočástic jsou naprosto důležité některé vlastnosti, jako je velikost, tvar a povrch ovlivňující jejich interakce s okolním prostředím.

Nanočástice mají velký potenciál i pro řadu dalších aplikací, jako je například léčba mnoha dědičných, ale i získaných genetických poruch pomocí genové terapie. V současné době se v oblasti genové terapie z velké části využívají liposomy a virům podobné nanočástice (Seow & Wood, 2009), které budou lépe charakterizovány v následujících kapitolách.

Přes obrovský přínos nanočástic, ať už v oblasti biomedicínských nebo průmyslových aplikací, je známo velmi málo o možných krátkodobých a dlouhodobých škodlivých účincích na zdraví a životní prostředí.

Tabulka č.1 Shrnutí nanočástic obsažených v BP

Tabulka shrnuje základní informace jako je velikost a tvar virů, liposomů a zlatých nanočástic. Zpracováno dle (S. Zhang et al., 2015)

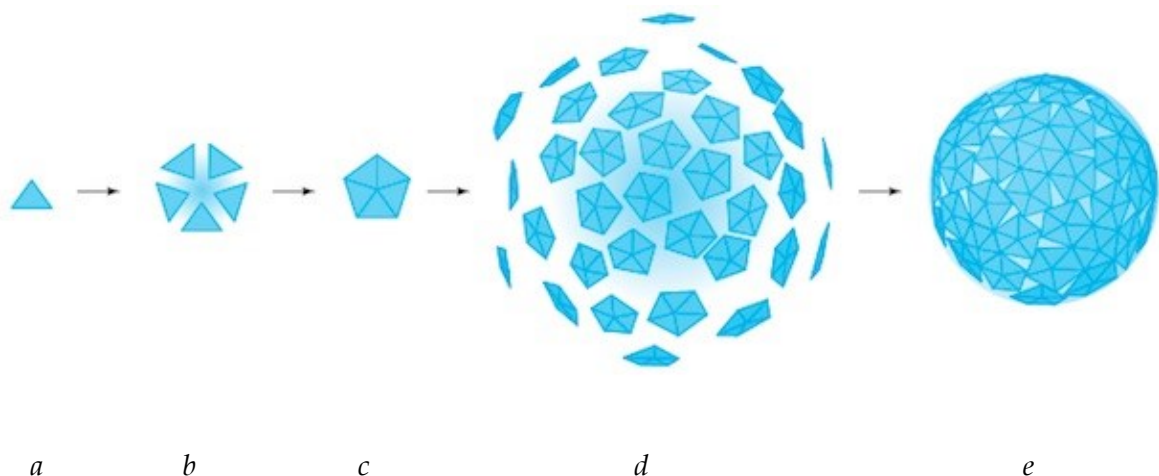
Typ NP	velikost	Tvar
Viry	10 nm - 300 nm	Dvacetistěnný/helikální/tyčinkovitý/dvanáctistěnný
Liposomy	10 nm - 1 μm	Sférický
Zlaté NPs	1 nm - 1 μm	Sférický, tyčinkovitý, hvězdicovitý,..

3. VIRŮM PODOBNÉ NANOČÁSTICE

Virové nanočástice neboli VLPs (z anglického virus-like particles) jsou takové částice, které jsou odvozeny od virů, sestaveny z virových strukturálních proteinů a neobsahují virový genetický materiál, jak lze vidět na obrázku č. 2. Bez genetického materiálu jsou tedy neschopné replikace. Přesto, že jsou VLPs složeny pouze ze strukturálních proteinů původního viru, jsou schopny aktivovat imunitní systém hostitele a zachovat si svou receptorovou specifitu. Zároveň je ale jejich využití bezpečné, protože jsou díky absenci genomu neinfekční (Salunke et al., 1989).

Mohou se vyskytovat jak přirozeně, přičemž k jejich tvorbě dochází spontánně během životního cyklu viru, tak i být připraveny uměle pomocí heterologního expresního systému, který umožňuje produkci strukturálních proteinů viru (Brun et al., 2011)

Důležité tedy je, že obsahují virové proteiny, které umožňují penetraci buněk virem a efektivní vstup přes buněčnou membránu. Viro podobné částice mají většinou stejnou strukturu jako viry, od kterých jsou odvozeny či produkovány. Mohou být tedy jak obalené, tak neobalené, sférické i vláknité. Dle analýzy z roku 2013 bylo již vytvořeno nejméně 110 částic z virů patřících do 35 rodin (Zeltins, 2013).



Obrázek č. 2 Skládání viru podobných nanočástic

Schéma skládání papilomavirové nanočástice (HPV VLP), a) Monomerní L1 protein, b) Interakce 5 L1 proteinů, c) Pentamer složený z L1 proteinů, d) Samouspořádávání pentamerů, e) Složený neinfekční HPV VLP ze 72 pentamer. Převzato a upraveno: Biopharmaasia.com

3.1. Využití VLPs

V dnešní době je známo několik možností využití virům podobných částic, mezi které patří vakcinace, vektory pro dodávku léčiv, imunoterapii a genovou terapii.

Vývoj VLPs citlivých na pH nabízí velký potenciál pro zlepšení terapeutických výsledků spojených s cíleným zaměřováním a uvolňováním léčiv. V souvislosti s dodávkou léčiv a terapeutik bylo provedeno několik experimentů založených na dodávce cytotoxického chemoterapeutika doxorubicinu (DOX). Doxorubicin byl navazován na rostlinné viry, např; *cowpea mosaic virus* (Aljabali et al., 2013), *cucumber mosaic virus* (Zeng et al., 2013) nebo k jádrovému antigenu viru hepatitidy B.

Dle experimentu založeném na jádrovém antigenu viru hepatitidy B (tHBcAg), složeném do VLP a polyakrylové kyselině (PAA), provedeném *in vitro* v podmínkách nádorové tkáně, je možné zabalit DOX-PAA do VLP bez jakýchkoliv modifikací molekul DOX, čímž je zachována jeho farmakologická aktivita. PAA je přidána do komplexu kvůli uvolnění DOX řízeným způsobem, protože ve fyziologickém pH 7,4 udržuje DOX ve VLP díky elektrostatické interakci mezi záporně nabitým PAA a pozitivně nabitým DOX. Interakce je v nízkém pH ale reverzibilní, takže dochází k uvolnění pouze tehdy, když se VLPs dostanou k nádorovým tkáním nebo do intracelulárních endosomů s pH okolo 5. Zároveň bylo v této studii prokázáno, že pokud je na povrchu komplexu DOX-PAA-VLP ligand kyselina listová (FA) interagující s folátovým receptorem (FR), je zlepšen příjem DOX kolorektálními rakovinnými buňkami a lék je uvolňován řízeným způsobem. FA molekuly byly konjugovány k Lys zbytkům pentadekapeptidu obsahující sekvenci interagující s VLP. (Biabanikhankahdani et al., 2016)

Částice lze využít ve vakcinologii, neboť fungují jako spolehlivý doručovací systém vyznačující se bezpečností a silnou imunogenicitou, tedy schopností konkrétní molekuly nebo látky (např. antigenu) vyvolat imunitní odpověď (Mahanty et al., 2015). Virům podobné nanočástice aktivují B lymfocyty, dochází k produkci protilátek, kterou vyvolávají povrchové opakující se motivy aminokyselin na VLP. Částice poté mohou být pohlceny buňkami prezentujícími antigen a následně degradovány, což vede k aktivaci T buněk. K aktivaci jak humorální, tak buněčné imunitní odpovědi může docházet i bez použití pomocných látek (adjuvants) (L. F. Zhang et al., 2000; Bachmann & Zinkernagel, 1997)

V souhlasu s tím, studie provedená Takamurou v roce 2008 prokázala úspěšnou indukci slizniční a systémové imunity po perorálním podání plazmidové DNA vakcíny

v perorálně přenosném VLP odvozeném z viru hepatitidy typu E (TEV) (Takamura et al., 2004).

4. LIPOSOMY

Liposomy jsou sférické mikroskopické vezikuly tvořené jednou nebo více fosfolipidovými dvojvrstvami, které zapouzdřují vodní kompartment (Simão et al., 2015). Tvoří se samovolně ve vodných roztocích a strukturálně se podobají lipidové membráně živých buněk. Poprvé byly popsány v šedesátých letech minulého století Banghamem a Hornem a od té doby jsou zkoumány jako nosiče pro dodávku bioaktivních látek.

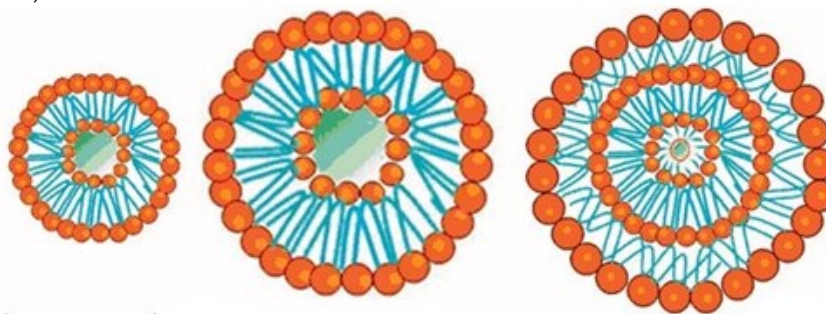
4.1. Typy liposomů

Liposomy lze rozdělit jak na základě jejich velikosti, tak na základě počtu dvojvrstev (obrázek č. 3) či na základě doručovaného materiálu. Velikost těchto váčků se pohybuje od několika nanometrů do řádu mikrometrů, avšak ty, které mají lékařské využití se pohybují ve velikostním rozmezí 50 až 450 nm (Bozzuto & Molinari, 2015; Etheridge et al., 2013).

Malé unilamelární liposomy (SUV) tvoří jedna lipidová dvojvrstva. Jejich velikost se pohybuje do 50 nm.

Velké unilamelární liposomy (LUV) jsou, stejně jako malé, tvořené jednou dvojvrstvou, nicméně jsou větší a stabilnější, než SUV.

Dalším typem těchto vezikul jsou velké multilamelární vezikuly (MLV) obsahující větší počet lipidových dvojvrstev, které ale způsobují pomalé uvolňování zapouzdřené molekuly (Tajes et al., 2014).



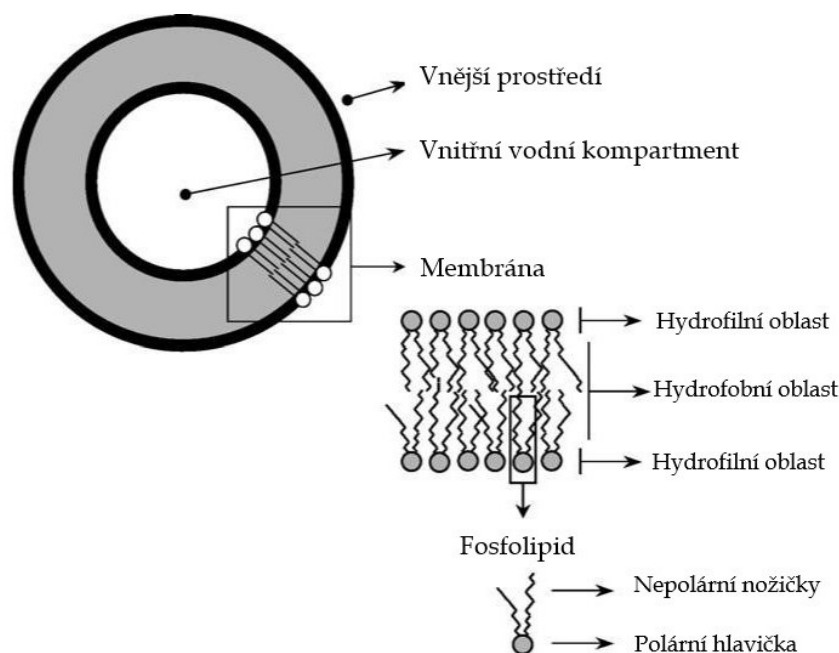
Obrázek č. 3 3 různé typy liposomů

a) SUV, b) LUV, c) MLV, převzato (Tajes et al., 2014)

4.2. Stavba liposomů

Jak již bylo zmíněno, liposomy jsou tvořené amfipatickými lipidovými, respektive fosfolipidovými dvojvrstvami. Jako amfipatické molekuly jsou označovány molekuly, které mají části s hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi. Fosfolipidy jsou lipidy obsahující deriváty alkoholu, dva estery mastné kyseliny a funkční skupinu - zbytek kyseliny fosforečné. Lze je rozdělit na glycerolfosfolipidy, u nichž je alkoholem glycerol, a sfingolipidy obsahující alkohol sfingosin. Hydrofilní hlavička, tvořena glycerolem, je orientovaná ven z membrány a spojena se dvěma hydrofobními nožičkami přes fosfátovou skupinu. Hydrofobní nožičky molekuly jsou tvořeny navázanými zbytky mastných kyselin a orientovány dovnitř membrány (obrázek č. 4).

Tyto molekuly se uspořádávají do energeticky nejvýhodnějších útvarů vůči vodě, tedy například do liposomů (případně micel, pokud je molekula fosfolipidu kónická). Uspořádávání je způsobeno amfipatickými vlastnostmi, kdy hydrofilní hlavička interaguje prostřednictvím polárních funkčních skupin s polárními molekulami vody a hydrofobní nepolární nožičky, které jsou ve vodě nerozpustné, interagují s jinými hydrofobními molekulami. Liposomy jsou tedy složeny z lipidové dvojvrstvy, zatímco micely jsou uzavřené lipidové monovrstvy (Alberts et al., 2002). Liposomy mohou být aniontové nebo kationtové, přičemž první zmíněné se běžně nepoužívají kvůli špatnému zapouzdřování. Kationtové liposomy se poté díky svému kladnému náboji mohou vázat s negativně nabitými molekulami, jako je i DNA a interagovat za vzniku komplexů nazvaných lipoplexy (Ruozi et al., 2003).



Obrázek č. 4 Schéma liposomu

Strukturní model membrány liposomu skládající se z fosfolipidů, které jsou složeny z hydrofilních polárních hlaviček orientovaných vně membrány a hydrofobních nožiček orientovaných dovnitř membrány. Liposom ohraničuje vodní kompartment, ve kterém může být uložena DNA/RNA/léky. Převzato a upraveno (Lopes et al., 2013)

4.3. Využití liposomů

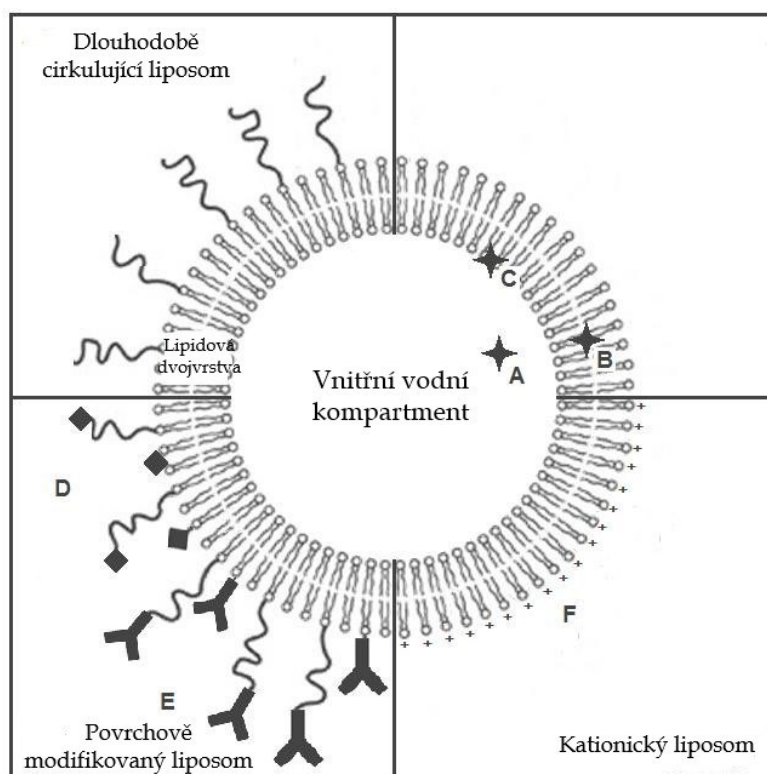
Liposomy jsou využívány jako modelový systém pro syntetickou biologii, takzvaný liposomální doručovací systém (LDS), protože mají univerzální vlastnosti lipidové dvojvrstvy, která slouží jako hranice daného váčku, a umožňují zapouzdření různých biomolekul do lumen nebo do samotné dvojvrstvy a poté doručení k buňkám (Deshpande et al., 2018). Rostoucí zájem o používání těchto systémů je také proto, že liposomy mohou zapouzdřovat nebo ukotvit látky jak rozpustné ve vodě, tak také látky rozpustné v tucích (Gómez & Fernández, 2006). Velikost doručovaných terapeutických látek se pohybuje od malých molekul po plazmidovou DNA obsahující terapeutické geny o velikosti několik kbp (Fenske et al., 2008). V případě využití liposomů v genové terapii, kationtové lipidy interakcí s negativně nabitou DNA vytváří komplexy – takzvané lipoplexy, s obvyklou velikostí 100 nm - 1 μ m, jejichž efektivita transfekce je také závislá na velikosti komplexu (Rejman et al., 2004). Jednou z hlavních výhod liposomů oproti většině ostatních doručovacích systémů je, že jsou

vyrobeny z přírodních, buňkám vlastních materiálů, lipidů a nelze tedy předpokládat toxické účinky těchto nosičů.

Při systémovém podávání liposomů se ukázalo, že RES, které má tendenci liposomy odstraňovat a svádět je do jater, sleziny a plic, znemožňuje jejich specifické cílení na jiné tkáně. Pokud by se podařilo snížit rychlost jejich odstranění pomocí RES, což by vedlo k prodloužení doby cirkulace v krvi, byla by umožněna účinná vazba s jinými cílovými buňkami a tkáněmi, než játra apod. Strategie prodloužení v oběhu spočívá například v zahrnutí cholesterolu, či polyethylenglykolu (PEG) (Gabizon & Papahadjopoulos, 1988). Tento problém je již překonán tak, jak je popsáno dále.

4.4. Modifikace povrchu

Fyzikálně-chemické vlastnosti liposomů určují rychlost úniku léků a míru jejich přirozené degradace, která může být ovlivněna například zařazením cholesterolu, který zvyšuje odolnost k biodegradaci (Barza et al., 1987). Dalším možným vylepšením je přidání hydrofilního biokompatibilního PEG na povrch liposomu (obrázek č. 5). Polyethylenglykol může výrazně prodloužit dobu liposomů v krevním oběhu tím, že stericky brání opsonizaci liposomu komplementem, což vede ke snížení interakce s buňkami RES (Shen et al. 2018). Zároveň bylo prokázáno, že prodloužená doba cirkulace liposomů umožňuje účinnou vazbu s cílovými buňkami, což je důležité, pokud jsou liposomy využívány jako LDS. Amfipatický PEG může také významně zvyšovat koncentraci liposomů v krevním oběhu (Klibanov et al., 2001).

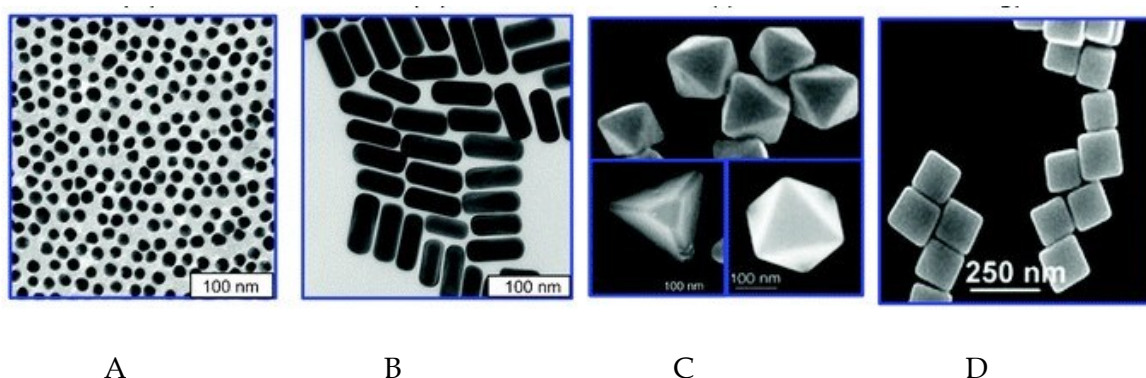


Obrázek č. 5 *Strukturní složení různých liposomů*

V pravém horním rohu jsou hydrofilní léčiva (A) začleněna do vnitřní vodné fáze liposomů, B) lipofilní léčiva začleněna do lipidové dvojvrstvy, C) amfifilní léčiva ve vnitřní části lipidové dvojvrstvy. V levém horním rohu jsou na liposom napojeny molekuly prodlužující jeho dobu v krevním oběhu- např. PEG. V levém dolním rohu jsou povrchově modifikované liposomy (D) nebo imunoliposomy (E) - ligandy mohou být připojeny přímo k povrchu liposomu (lipidu) nebo k okraji hydrofilního polymeru, připojenému k povrchu liposomu. V pravém dolním rohu je kationický liposom (F), používaný pro přenos DNA, tedy lipoplex. Převzato a upraveno z (Lopes et al., 2013)

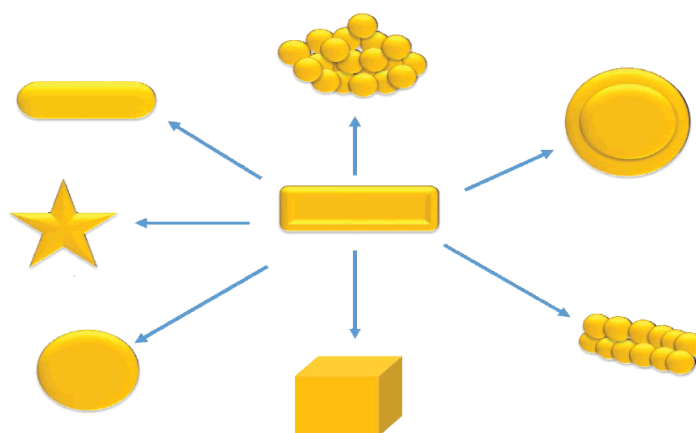
5. ZLATÉ NANOČÁSTICE

Zlaté nanočástice (AuNPs z anglického gold - Au - nanoparticles) našly díky svým optimálním vlastnostem, jako je snadná syntéza, nízká toxicita a vysoká stabilita, uplatnění v biomedicíně, jakožto nosiči terapeutického materiálu do cílových buněk. Navíc s významným pokrokem v nanotechnologii během posledních desetiletí mohou být AuNPs syntetizovány v rozsáhlém spektru tvarů od sférických částic, přes tyčinkovitý tvar, hvězdy, až například k oktaedrům, jak je vidět na následujících obrázcích č. 6 a 7. Nicméně jejich využití je omezené proteinovou korunou, která vzniká jako výsledek interakce proteinu s AuNPs (Liu & Peng, 2017).



Obrázek č. 6 Typy tvarů zlatých nanočástic

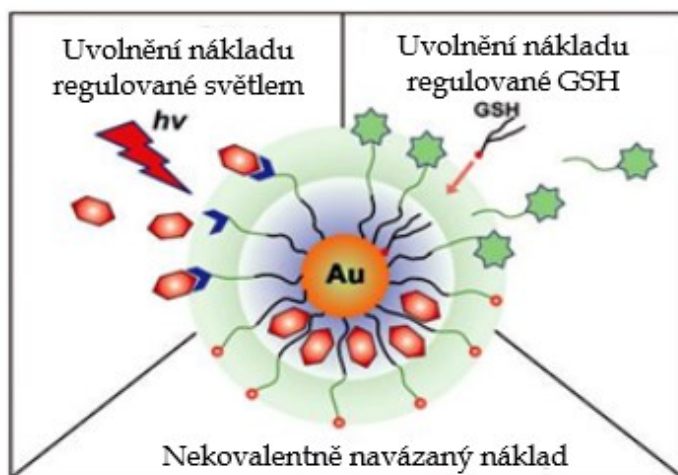
A) Sférické GNPs, B) Tyčinkovité GNPs, C) Tetrahedrální, octahedrální GNPs, D) Krychlové GNPs. Převzato a upraveno z (Dykman & Khlebtsov, 2012)



Obrázek č.7 Nákres dalších možných tvarů zlatých nanočástic

Převzato z (Alaqaad & Saleh, 2016)

Nosiče napomáhají průchodu terapeutických látek přes buněčné membrány, neboť volná nukleová kyselina by sama díky svému aniontovému náboji a degradaci nukleázami nebyla schopna „přežít“ v extracelulárním prostředí, stejně tak jiné hydrofobní léky. Předpokladem úspěšné léčby je účinné uvolňování těchto látek. Uvolňování je ovlivněno a vyvoláno obecně stimulatory, a to jak vnitřními, tak vnějšími. Vnitřními jako například pomocí pH nebo glutathionu (GSH), jehož koncentrace je v intracelulárním prostředí vyšší. V tomto prostředí se (GSH) svými thiolovými skupinami váže na AuNPs a způsobí uvolnění nákladu, který byl přes thiolové vazby na AuNP připojen (Hong et al., 2006). Vnější stimuly proti tomu kontrolují uvolnění časově a prostorově. Účinného uvolnění lze dosáhnout ozářením fotolabilní zlaté nanočástice UV zářením (o vlnové délce 350 nm – UVA). UV záření způsobí změnu povrchového náboje a následné uvolnění nákladu (Gang et al., 2006). Působení těchto stimulatorů lze vidět na obrázku č. 8.



Obrázek č. 8 Schématické naznačení použití vnitřního a vnějšího stimulatoru na AuNPs.

Vlevo nahoře uvolnění molekuly z částice regulováno světlem, Vpravo nahoře uvolnění regulováno vnitřním stimulatorem GSH. Ve spodní části nekovalentní navázání léku na částici. Převzato z (Kim et al., 2009)

Výhodou AuNPs je mimojiné jejich snadná syntéza a funkcionalizace, obecně prostřednictvím thiolových vazeb. Pro doručování látek do buněk je dokumentováno použití AuNPs do 1 μm , nicméně bylo prokázáno, že menší částice se dokáží vyhnout RES, složenému z krevních monocytů a tkáňových makrofágů (Gibson et al., 2007).

5.1. Funkcionalizace povrchu

Funkcionalizace je chemická modifikace povrchu částic, která nanočásticím dodává unikátní vlastnosti. Obecně dochází k navazování chemických látek na částice za účelem zvýšení jejich biologické kompatibility. Nanočástice reaguje s vícefunkčními molekulami, přičemž jedna funkční skupina poté slouží k přichycení na povrchu nanočástice a ostatní jsou přístupné k navázání dalších chemických látek. Funkcionalizované nanočástice se poté využívají hlavně k detekci biomolekul nebo celých buněk (Zhou et al., 2009).

5.2. Proteinová korona

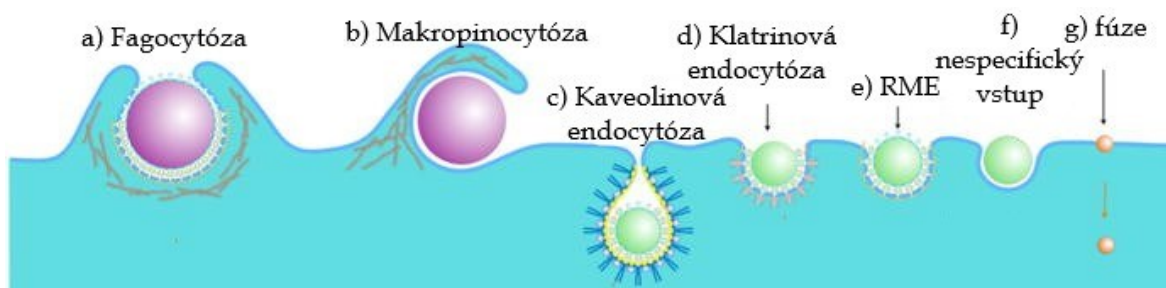
Po vstupu do organismu nebo do fyziologického prostředí jsou na povrch nanočástic postupně adsorbovány proteiny a dochází k tvorbě proteinové korony (PC). Porozumění interakcím, které vznikají mezi AuNPs a PC je zásadní pro vývoj cílených dodávek nanočástic, protože adsorbované proteiny určují nejen fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástice, ale i ovlivňují mechanismus buněčného vychytávání částic (Salvati et al., 2013). Dopad adsorpce byl zatím definován pouze u některých proteinů na základě předchozí znalosti jejich biologických funkcí. Například apolipoproteiny, označované jako dysopsoniny, prodlužují oběh v krevním řečišti, protože dochází k redukci příjmu RES. Imunoglobuliny a C3b komplement naopak napomáhají k vychytávání monocytu (Ritz et al., 2015; Cedervall et al., 2007).

5.3. Využití zlatých nanočástic

Kromě uplatnění AuNPs jakožto nosičů léků do buněk, jsou zlaté nanočástice využívány mimo jiné ve fototermální nádorové terapii (Hirsch et al., 2003) nebo zobrazovací diagnostice (Zhao Yongfeng et al., 2013) a k detekci onemocnění. Své využití našly ale i v jiných odvětvích, jako je rozbor a čištění vod nebo biochemie.

6. VSTUP NANOČÁSTIC DO BUNĚK

Import a export molekul vstupujících do buněk je regulován zejména plazmatickou membránou, která buňce slouží jako jakási hranice. V závislosti na povrchové úpravě a velikosti nanočástic může vstup do buněk probíhat různými cestami, které jsou znázorněny na obrázku č. 9, přičemž vstup pomocí endocytózy je v další části práce rozebrán podrobněji.



Obrázek č. 9 Možné způsoby internalizace nanočástic do buňky

Na obrázku lze vidět 7 různých možností vstupů nanočástic do buňky a zapojení různých proteinů: a) fagocytóza, b) makropinocytóza, c) kaveolinová endocytóza, d) klatrinová endocytóza, e) endocytóza zprostředkovaná receptorem (RME), f) nesespecifický vstup do buňky, g) fúze/translokace. Převzato a upraveno z (S. Zhang et al., 2015)

Pro doručování genů je po vstupu do buňky cílem jádro buňky. Cílená dodávka až do jádra je náročná, neboť každá nanočástice musí splňovat několik požadavků, jako je například vstup prostřednictvím endocytózy zprostředkované receptorem, uniknutí endozomálně lysosomálnímu systému, dále musí mít nukleární lokalizační signál (NLS), který interaguje s nukleárními póry o průměru 20 až 50 nm v závislosti na buněčné linii a zároveň musí být částice dostatečně malá k překročení jaderné membrány (Tkachenko et al., 2003).

Mnohé viry kódují proteiny, které zaručují proniknutí virových komponent do jádra. S ohledem na tato tvrzení byla zkoumána schopnost nanočástic zlata (o velikosti 20 nm), s peptidy odvozenými od virových proteinů, projít membránou a dostat se až k jádru buněk HepG2. AuNPs byly modifikovány obalem bovinního sérového albuminu (BSA) konjugovaného s peptidy, jejichž sekvence a původ lze vidět v tabulce č. 2. Bylo zkoumáno 5 komplexů:

- 1) AuNPs s navázaným peptidem s NLS z viru SV40 (Simian virus 40),

- 2) AuNPs s peptidem s NLS z adenoviru,
- 3) AuNPs s peptidem zprostředkovávajícím RME z adenoviru,
- 4) AuNPs s jedním dlouhým peptidem zprostředkovávajícím RME a NLS z adenoviru,
- 5) AuNPs s krátkým peptidem zprostředkovávajícím RME z adenoviru a s krátkým peptidem s NLS z adenoviru (oba peptidy připojeny k AuNP jako samostatné části).

Tabulka č. 2 Peptidové sekvence odvozené z virových proteinů

Zpracováno podle (Tkachenko et al., 2003)

peptidová sekvence	Zdroj a funkce peptidu	Komplex
CGGGPKKKRKVGG	NLS z velkého T antigenu SV40	1
CGGFSTSLRARKA	NLS z adenoviru	2
CKKKKKKSEDEYPYVPN	RME z adenoviru	3
CKKKKKKSEDEYPYVP- NFSTSLRARKA	Protein vlákna z adenoviru	4
CKKKKKKSEDEYPYVPN + CGGFSTSLRARKA	NLS + RME z adenoviru	5

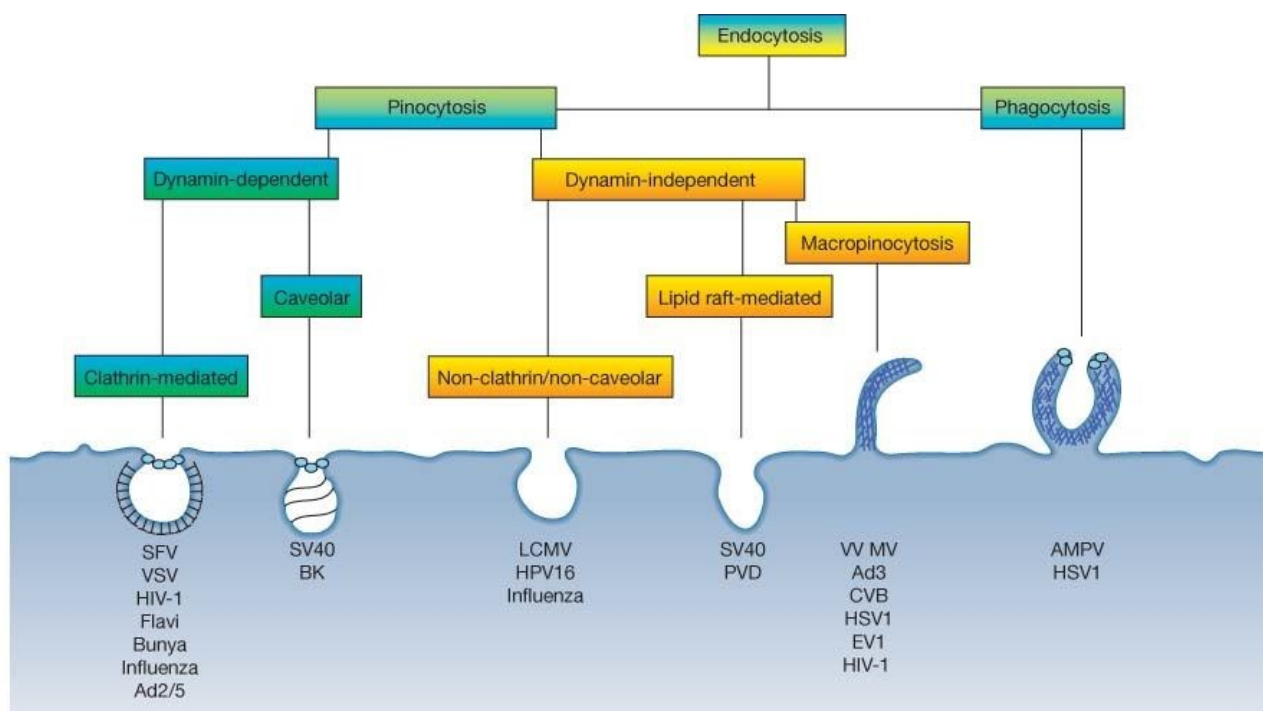
Částice, na kterých byl navázán pouze peptid s NLS (komplex 1 a 2), se nebyly schopny dostat k jádru, protože nemohly vstoupit do buňky nebo byly zachyceny v endosomech. Komplex 3 do buňky sice vstoupil, ale zůstal uvězněn v endosomu. Komplexy 4 a 5 se k jádru dostaly, nicméně bylo účinnější, pokud byly dva peptidy připojeny k nanočásticím než jeden dlouhý peptid se dvěma signály (Tkachenko et al., 2003). Z výsledku této studie lze usuzovat, že vstup nanočástic do jádra je podmíněn RME, ale i způsobem, jakým jsou peptidy k nanočástici připojeny (jako jeden dlouhý peptid nebo dva krátké).

6.1. Endocytóza

Endocytóza je využívána eukaryotickými buňkami k vychytávání a vstupu extracelulárních živin, toxinů, virů nebo nanočástic do buňky. Zahrnuje celou řadu mechanismů, při kterých částice, která má být endocytována, musí být buněčnou membránou uzavřena do vakuoly, čímž je umožněn průchod do buňky. K vytvoření vakuoly je nutná energie k překročení termodynamické bariéry, přičemž nejlépe prozkoumanou endocytickou dráhou je dráha využívající tvorbu klatrinových vakuol. Vakuoly jsou po průchodu do buňky řízeny ke konkrétním intracelulárním cestám. Je předpokládáno, že tvar, velikost a další aspekty nanočástic ovlivňují jejich vstup do buňky.

Endocytické procesy jsou definovány podle společných znaků, které jsou pro ně specifické, jako jsou signální molekuly, typ a velikost nákladu nebo závislost na receptorech. Systémů rozřazujících jednotlivé endocytické mechanismy je velké množství, v této práci se budu pro přehlednost držet systému dle Connera a Schmid (Conner & Schmid, 2003).

Vstup nanočástic je možný pomocí endocytózy, nespécifického vstupu, případně přímé difuze. Endocytóza zahrnuje pět procesů a to fagocytózu, makropinocytózu, endocytózu zprostředkovanou klatrinem, endocytózu zprostředkovanou kaveolinem a endocytózu nezávislou na klatrinu a kaveolinu, přičemž poslední tři zmíněné způsoby vstupu jsou označovány společným termínem endocytóza zprostředkovaná receptorem (RME). Pro hodnocení vzájemných interakcí mezi nanočásticí a buňkou může být komplikujícím faktorem to, že nelze vyloučit současné využití různých typů vstupu do buňky, jak je pozorováno u virových nanočástic, kdy virus může využívat více než jednu endocytickou cestu, jak je vidět na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10 Viry a endocytóza

Na obrázku lze vidět možné vstupy virů do buňky, přičemž například influenza virus, SV40, HIV-1 využívají více endocytických drah. Převzato z (Mercer & Helenius, 2009)

Částice, patogeny, případně liposomy o velikosti 1 μm nebo větší mohou vstoupit do buňky pouze pomocí fagocytózy (fagocytární buňky) nebo makropinocytózy. (Rejman et al., 2004). První zmíněný způsob, tedy fagocytóza, se využívá k vychytávání mrtvých buněk a patogenů makrofágy a dendritickými buňkami. Makropinocytóza je aktinem regulovaný proces, při kterém dochází k neselektivnímu vychytávání molekul společně s extracelulární tekutinou. Přestože je makropinocytóza receptorově nezávislý proces, k její aktivaci příležitostně může docházet i po aktivaci receptorů nebo stimulací růstového faktoru (Meier et al., 2002). Vstupující nanočástice je společně s tekutinou obalena výběžkem buněčné membrány a uzavřena do váček nazývajících se makropinosomy, které mohou mít průměr až 5 μm . Rozdílem mezi makropinocytózou a klatrinovou endocytózou na úrovni regulace je fakt, že makropinocytóza vyžaduje reorganizaci aktinových cytoskeletů. Působením inhibitoru fosfatidylinositol-3-kinázy bylo zjištěno, že inhibice aktinu inhibuje makropinocytózu, ale na klatrinovou endocytózu nemá vliv (Araki et al., 1996). Makropinocytóza je příležitostně využívána i některými infekčními patogeny, například virus vaccinia si vyvinul strategii pro indukci vstupu pomocí této dráhy. Vaccinia se obalí membránou z umírající infikované buňky obsahující fosfatidylserin a indukuje vstup napodobením apoptického materiálu (Lim & Gleeson, 2011).

Menší částice o velikosti v řádu nanometrů naproti tomu vstupují do buněk RME za vzniku kaveolinových či klatrinových váček (S. Zhang et al., 2015). Nanočástice bez funkcionalizace a konjugovaných ligandů samozřejmě nemohou vstoupit RME, nýbrž mohou být internalizovány pomocí nesespecifických interakcí nebo přímou difuzí.

Klatrinová endocytóza je nejlépe charakterizovanou endocytickou cestou a zároveň nejběžnější endocytickou cestou využívanou viry a funkcionalizovanými NPs. Při tomto typu RME se ligand na konkrétní nanočástici naváže na receptor na membráně, dojde ke změně konformace receptoru, adaptorový protein donutí klatrin zpolymerovat z původní monomerní formy a vytvoří se váček o velikosti 60-200 nm, který je pomocí „molekulárních nůžek“ - dynaminu odštípnut od membrány. Klatrin je protein složený ze tří těžkých a tří lehkých řetězců tvaru triskelionu. Po interakci jednotlivých triskelionů vznikne mřížka, která poté obklopuje vstupující nanočástici (Royle, 2006)

Kaveolinová endocytóza dokáže obejít nízké pH tím, že je zabráněno lysozomálnímu zacílení, což je užitečné při dodávce léčiv, které jsou náchylné k degradaci v kyselém prostředí (Suen & Chau, 2014). Tímto způsobem by bakterie nebo viry, například SV40, vstupující do buňky touto cestou mohly uniknout trávení lysozomů. Po navázání se na receptor dochází

k tvorbě kaveolinového váčku kolem virových částic, které transportují virus do endosomů a endoplazmatického retikula (Kartenbeck et al., 1989).

Rozdílně od endocytických drah vstupují do buňky malé částice a molekuly menší než 1 nm. Ke vstupu dochází primárně pasivní difuzí přes membránové kanály a lipidové dvojvrstvy (Zhang et al., 2015). V případě vstupu přímou penetrací bylo zjištěno, že tvar a velikost nanočástic je rozhodující faktor pro jejich translokaci přes lipidovou membránu (Yang & Ma, 2010). Nicméně přímou fúzí mohou také vstupovat tzv. fúzogenní liposomy o velikosti až v řádu mikrometrů, sestavené z liposomů s navázanými obalovými proteiny *Sendai* viru (Nakanishi et al., 1985).

Endocytické cesty jsou zkoumány pomocí inhibitorů daných typů endocytózy. Tyto studie se využívají k pochopení výběru endocytické cesty nanočásticemi různých velikostí. Například jako inhibitor klatrinové endocytózy se používá chlorpromazin a methyl- β -cyklodextran (M β CD) je používán jako inhibitor kaveolinové endocytózy. Oba inhibitory zpomalují internalizaci částic (Suen & Chau, 2014).

Účinnost vstupu pomocí endocytózy přímo ovlivňuje několik vlastností spojených jak se vstupující nanočásticí, tak s danou lipidovou membránou. V dalších odstavcích se budu snažit dané aspekty přiblížit.

6.1.1. Velikost a tvar nanočástic

Jednou z vlastností, která bezesporu na účinnost vstupu do buňky má vliv, je velikost vstupující částice. Dle experimentálních studií je optimální průměr nanočástic pro endocytózu v rozmezí 25-50 nm (Osaki et al., 2004), což souhlasí i s počítačovými simulacemi a teoretickými výpočty (Gao et al., 2005; Vácha et al., 2011).

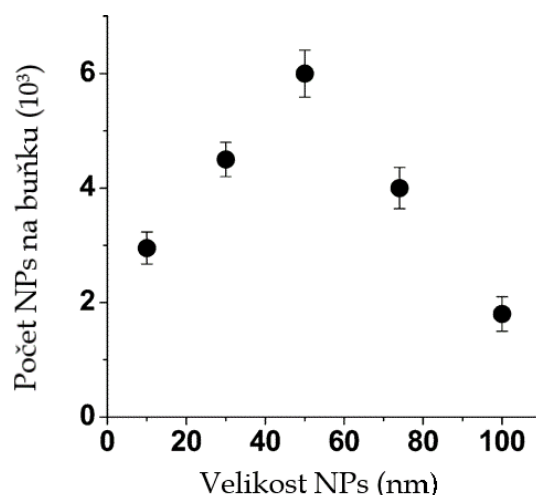
Optimální velikost částice 50 nm pro vstup do buňky potvrzuje experiment provedený Chithranim na Univerzitě v Torontu v roce 2006 s využitím AuNPs různých velikostí sférických a tyčinkovitých tvarů. (Chithrani et al., 2006). Zlaté nanočástice různých velikostí, o průměru 14, 30, 50, 74 a 100 nm, byly stabilizovány citranem sodným a inkubovány v médiu se sérem s HeLa buňkami po dobu 6 hodin. V prvních hodinách byl vstup nanočástic

maximální, poté se míra absorpce postupně zpomalovala, až po cca 5 hodinách došlo k plató efektu. Na obrázku č. 11 lze vidět NPs internalizované v buňce.

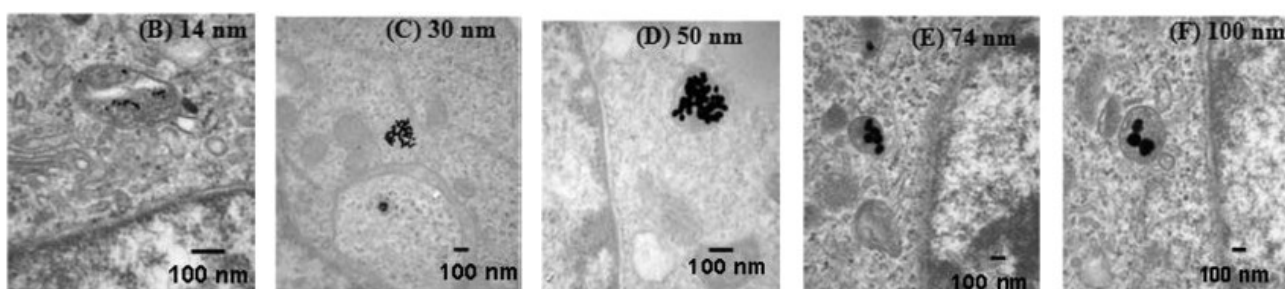
Graf č. 1 Závislost míry buněčného vychytávání na velikosti AuNPs.

V grafu je zobrazen počet zlatých nanočástic, které vstoupily do buňky vzhledem k velikosti nanočástice.

Převzato a upraveno z (Chithrani et al., 2006)



Bylo zjištěno, že buněčná absorpce je závislá na velikosti vstupující částice. Maximální příjem nastává ve zmiňované velikosti 50 nm, dle výpočtů bylo jednou buňkou přijato průměrně 6000 zlatých nanočástic v této velikosti. Maximální počet nanočástic, které buňka dokáže přijmout je 3000 u 14 nm NPs, 6160 u 50 nm NPs a 4000 u 74 nm NPs (graf č. 1)



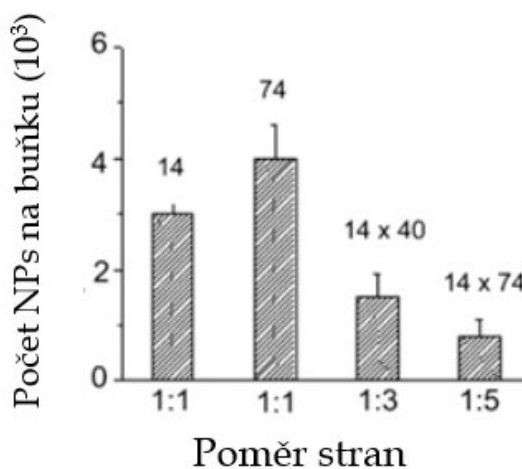
Obrázek č. 11 Zlaté nanočástice různých velikostí po vstupu do buňky.

Na obrázku D) lze vidět největší koncentraci AuNPs internalizovaných v buňce. Jedná se o nanočástice velikosti 50 nm. Převzato a upraveno z (Chithrani et al., 2006)

Efektivita buněčného vychytávání je kromě velikosti nanočástice ovlivněna i geometrií a poměrem stran u konkrétního tvaru částice (Qiu et al., 2010). Například příjem zlatých nanočástic tvaru tyčinky je mnohonásobně menší než příjem sférických nanočástic. Dle experimentu HeLa buňky přijaly o 500 % a 375 % procent více sférických zlatých nanočástic o velikostech 74 a 14 nm, než zlatých tyčinek velikosti 74 x 14 nm. Nicméně buněčné vychytávání tyčinkovitých struktur s nižším poměrem stran (1:3) je vyšší, než vychytávání nanočástic s vyšším poměrem stran (1:5), jak je vidět na grafu č.2 (Chithrani et al., 2006).

Graf č.2 Závislost míry buněčného vychytávání na tvaru a poměru stran nanočástice.

Na grafu je zobrazen počet nanočástic, které vstoupily do buňky vzhledem k tvaru (velikosti) a poměru stran nanočástice. Převzato a upraveno z (Chithrani et al., 2006).



I přes velmi cenné výsledky, které práce Chithraniho a spolupracovníků přinesla, je třeba zdůraznit, že internalizace může být ovlivněna nejen velikostí částic, ale i spektrem sérových proteinů, které adsorbovaly na povrch zkoumaných nanočástic.

Velikost internalizované nanočástice má mimo jiné vliv i na způsob endocytózy. Tímto se ve svém experimentu zabýval Rejman v roce 2004. Zkoumal závislost velikosti fluorescenčních latexových částic definovaných velikostí (50, 100, 200, 500 a 1000 nm) na způsob internalizace do nefagocytární buněčné linie B16. Pro srovnání účinnosti kaveolinové a klatrinové cesty použil ligandy; transferin pro klatrinovou endocytózu a ligand LacCer pro kaveolinovou. Latexové nanočástice s navázaným ligandem byly zkoumány namísto liposomů (lipoplexů), protože tyto nanočástice je obtížné vytvořit ve stejných velikostech tak, aby na jejich základě mohla být vyvozena závislost mezi velikostí NPs a endocytickou dráhou. vstupují do buněk nanonanočástice alespoň 200 nm velké, zároveň však menší než 1 μm v průměru, endocytózou zprostředkovanou kaveolinem.

V této studii bylo zjištěno, že nanočástice s průměrnou velikostí 50, 100 a 200 nm vstupují do buněk klatrinovými váčky a NPs alespoň 200 nm velké, zároveň však menší než 1 μm v průměru, endocytózou zprostředkovanou kaveolinem. K ověření, zda jsou tyto dráhy závislé na cholesterolu, byly buňky předem inkubovány s M β CD a lovastatinem, který inhibuje de novo syntézu cholesterolu. Bylo prokázáno, že obě dvě dráhy, kaveolinová i klatrinová jsou závislé na cholesterolu. U částic o velikosti 1 μm nebyla pozorována žádná adsorpce na buněčnou membránu (Rejman et al., 2004).

S velikostí nanočástic a typem endocytózy souvisí i rychlost. V případě nanočástic vstupujících klatrinovou cestou, tedy nanočástic 50 až 200 nm velkých, internalizace začínala okamžitě při teplotě 37 °C po počáteční vazbě při teplotě 4 °C a pokračovala po dobu cca 3 h. Během 30 minut bylo internalizováno přibližně 50 % latexových kuliček, které byly s buňkou navázány. Naproti tomu u nanočástic velikosti 500 nm nebyl po dobu 30 minut pozorován žádný vstup a akumulace NPs v buňkách byla detekována po 2-3 hodinách (Rejman et al., 2004).

Nanočástice o velikosti 50, 100, 200 nm byly nahromaděné v perinukleárním prostoru, částice velké 500 nm byly proti tomu lokalizovány převážně po obvodu uvnitř buněk. Ani po 4 hodinách při 37 °C se větší částice nedostaly do lyzozomálního prostoru. Přestože čistá internalizace větších částic může být menší ve srovnání s menšími částicemi, uvolňování DNA z lipoplexu může být účinnější vzhledem k prodloužené době v prostoru buňky před lyzozomální degradací (Rejman et al., 2004).

V souhlasu s experimentálními studii, podle kterých je optimální velikost pro endocytózu 50 nm, je dle teoretického modelu optimální průměr částic 50-60 nm a maximální buněčná absorpce se pohybuje od 500 do 5000 nanočástic na jednu buňku. V modelech u nanočástic s poloměrem 20 nm k endocytóze téměř nedochází, protože adhezivní energie je příliš nízká, aby kompenzovala energii vynaloženou na ohýbání membrány. A naopak u nanočástic s poloměrem 60 nm dochází k endocytóze zprostředkované receptory také jen zřídka, protože téměř všechny nanočástice jsou pouze částečně zabalené, neboť se vyčerpají volné receptory (Zhang et al., 2009).

Zároveň dle teoretických výpočtů rychlost částice při vstupu do buňky pomocí RME je omezena difuzí receptorů směrem k NP a předpokládaná nejkratší možná doba internalizace pro NP s průměrem 50 nm je přibližně 20 min (Gao et al., 2005).

Geometrie nanočástic je dalším aspektem, který přitahuje pozornost, protože buněčná membrána může interagovat s nanočásticemi různých tvarů, jako jsou tyčinky, listy nebo případně hvězdice. Odlišný tvar (v porovnání s klasickou koulí) má vliv na vstup do buňky. Jedním z možných rozdílů při interakci anizotropních nanočástic s membránou, je rotace nanočástic, ke které může docházet z důvodu snahy o minimalizaci volné energie. Spontánní rotace nemá velký vliv na interakci mezi nanočásticí a membránou, zároveň je přechodná a byla též pozorována u nanočástic různých tvarů jako důsledek

jejich vzájemného ovlivňování se. Rotace částic může ale způsobit prasknutí membrány jako následek smykové síly vynaložené nanočásticemi na membránu (Yue et al., 2015).

Pro výzkum vstupu tyčinkovitých nanočástic byl využit rostlinný virus tabákové mozaiky (TMV z anglického tobacco mosaic virus), s délkou 300 nm, vnějším průměrem 18 nm a vnitřním 4 nm.

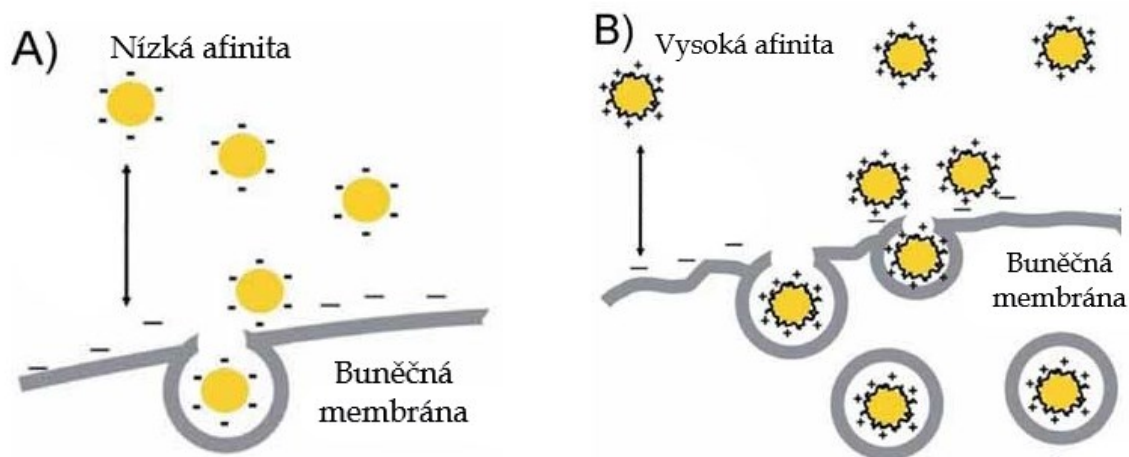
Ke studiu vlivu poměru stran tyčinkovitých nanočástic na buněčné vychytávání lze velikost částic TMV upravit ultrazvukem, čímž lze získat částice o různé délce, ale o shodném průměru 18 nm, tedy stejném průměru jako u nativní částice TMV. Ultrazvuk povrchový náboj částic TMV nezměnil. Poté lze částice o stejném poměru stran oddělit a separovat centrifugací v sacharózovém gradientu, neboť částice s různými délkami mají odlišné rychlosti sedimentace. Byly získány částice s délkou 70 nm (TMV4), 140 nm (TMV8) a 300 nm (TMV17) a shodným průměrem 18 nm.

Pro potvrzení různorodosti vstupu TMV s odlišnými poměry stran byly použity inhibitory specifické pro dané cesty (Amilorid jako inhibitor makropinocytózy, chlorpromazin u klatrinové endocytózy a genistein u kaveolinové). Účinnost vychytávání byla zkoumána na endotelových HUVEC a epiteliálních HeLa buňkách.

Klatrinová endocytóza se vyskytovala hlavně u HUVEC buněčné linie u TM4 a TM8, zatímco kaveolinovou endocytózu využívaly hlavně TMV17 v HUVEC i HeLa buňky. Makropinocytózu pro vstup do buňky nevyužívaly žádné nanočástice. Zároveň TMV4 a TMV8 vstupovaly do buněk rychleji, než částice TMV17 (Liu et al., 2016). Tato studie tedy potvrdila vliv poměru stran jednotlivých nanočástic na způsob jejich vstupu do buňky

6.1.2. Povrch a náboj nanočástic

Povrch částic a typ ligandu je další aspekt, který ovlivňuje úspěšnost vstupu do buněk. Aniontové molekuly se váží na buněčnou membránu méně efektivně, než kationtové nebo neutrálně nabitě molekuly. Menší efektivita aniontových molekul je způsobena negativním nábojem přítomným na membráně i částici, pokud nedojde k silné interakci mezi částicí (ligandem) a membránou (receptorem), nanočástice nemůže projít. Efektivněji do buněk vstupují pozitivně nabitě nanočástice (Cho et al., 2009), což lze vidět na obrázku č. 12. K silné adhezi na povrch membrány může dojít ale i kyselým pH. To je důvod, proč se využívají makromolekuly bohaté na lysin a pozitivně nabitě nanočástice pro transport látek do buněk.

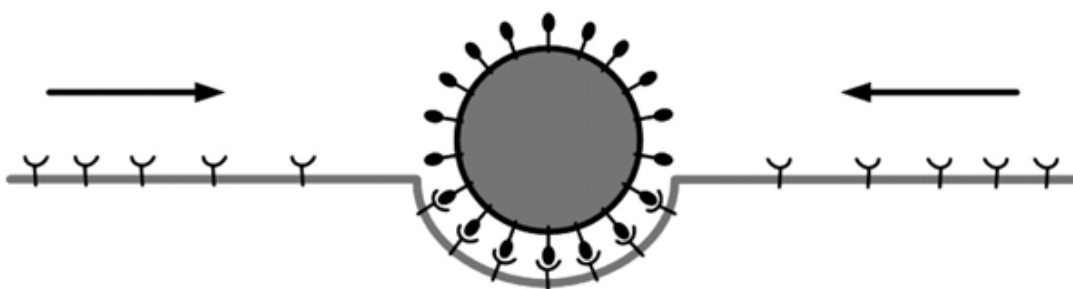


Obrázek č. 12 Rozdíl v efektivitě vstupu v závislosti na povrchovém náboji NPs

Na Obrázku A lze vidět negativně nabitě NPs, které se váží na negativně nabitou membránou podstatně hůře, než pozitivně nabitě NPs (B). Převzato a upraveno z (Cho et al., 2009)

6.1.3. Vazba receptor – ligand

Při RME dochází k interakci ligandů na nanočásticích s receptory na buněčné membráně. Dle teoretického modelu jsou receptory na buněčné membráně pohyblivé a difundují na místo balení, kde se váží s imobilními ligandy. Receptory jsou před kontaktem s částicemi rovnoměrně rozmístěny, ale jakmile dojde ke kontaktu, hustota receptorů se v místě interakce postupně zvyšuje tak, aby pokryla ligandy na NP. Zároveň navázání ligandu způsobí snížení volné energie a receptory jsou poté difuzí přitahovány ke kontaktní oblasti, což vede k vyčerpání receptorů v okolí (Gao et al., 2005) (obrázek č. 13).



Obrázek č. 13 Schéma membrány obsahující mobilní receptory, která obaluje nanočástici pokrytou ligandy.

Naznačen pohyb mobilních receptorů směrem ke kontaktnímu místu nanočástice s buněčnou membránou.

Převzato a upraveno z (Gao et al., 2005)

Vazebná energie interakce ligand-receptor musí překonat termodynamickou energetickou bariéru, která vzniká v důsledku napětí membrány. Pokud vstupuje nanočástice s optimálním poloměrem, energetická bariéra je relativně malá, a proto je buněčná absorpce vysoká. Nicméně při větším poloměru částic je energetická bariéra výraznější. Pro překonání bariéry blokují nanočástice receptory během endocytózy, čímž dojde k rychlému vyčerpání volných receptorů na buněčné membráně (s rostoucím poloměrem částic). Hustota receptorů typicky bývá 100–400 receptorů na μm^2 . Receptory po vstupu nanočástice do buňky mohou být recyklovány zpět nebo mohou být degradovány v endosomech a lysozomech (S. Zhang et al., 2009).

6.1.4. Interakce nanočástic

Dle výsledků teoretického modelu Chaudhuriho v roce 2011 je patrné, že interakce mezi nanočásticemi přítomnými na buněčné membráně, mohou mít vliv na proces vychytávání. V souvislosti s nanočásticemi byly zkoumány interakce jak přitažlivé, tak odpuzující. V případě přitažlivých interakcí bylo zjištěno, že vedou ke sdružování nanočástic, to poté snižuje hodnotu volné energie potřebné pro balení nanočástic do váčků a tím je možné zabalit NPs menších velikostí. Odpudivé interakce naopak způsobují snížení schopnosti buněčného vychytávání (Chaudhuri et al., 2011).

6.1.5. Příjem měkkých struktur

Při endocytóze částic, které mají podobnou tuhost jako buněčná lipidová membrána, tedy liposomy nebo nanočástice potažené dlouhými polymery, dochází k deformaci jak buněčné membrány, tak i samotných nanočástic. (S. Zhang, Gao, & Bao, 2015). Dle teoretického modelu měkké NPs vyžadují více energie k úplnému zabalení (protože se tvar mění v průběhu balení), než pevné NPs (Yi & Gao, 2015).

6.1.6. Typ buněčné linie

Vstup nanočástic do buňky může být ovlivněn i typem buněčné linie, do které vstupují. Bylo zjištěno, že lze najít odlišnosti mezi vstupem do epiteliálních a endotelových buněk, které plynou z rozdílu membránových proteinů, propustnosti membrány, polaritu nebo asymetrie buněčné membrány, ta je například běžnější u endotelových buněk. Zároveň je i u endotelových buněk vyšší exprese caveolinu než na epiteliální buněčné membráně (Liu et al., 2016).

6.2. Rozdílný vstup nanočástic a nákladu

S rozdílem od klasické endocytózní cesty mohou vstupovat do buněk pozitivně nabitě kationtové nanočástice a buňku penetrující peptidy (CPPs, též nabitě pozitivně) energeticky nezávislým způsobem. Dle simulací molekulární dynamiky modelová buněčná membrána vytváří otvor, kterým se kationtové zlaté nanočástice a HIV-1 Tat peptid translokují do cytoplazmy díky transmembránovému potenciálu. Po vstupu do buňky se buněčná membrána během μ sekundy sama zafixuje. Proces je tedy energeticky nezávislý, ale závislý koncentračně a extrémně rychlý (Lin & Katz, 2013; Cho et al., 2009).

Kromě celé nanočástice může dojít ke vstupu do buňky pouze navázaného nákladu. Látky, které jsou nekovalentně navázané na částice (polymer) se mohou cíleně uvolnit, působením stimulátorů a projít přes membránu zprostředkovanou difuzí (Kim et al., 2009).

7. ZÁVĚR

Viru podobné nanočástice, liposomy i zlaté nanočástice představují slibné nanonosiče transportující náklad k buňkám či do buněk. Všechny tyto nanočástice mají řadu výhod i nevýhod. Co se týká výhod u přirozených nanočástic, tedy viru podobných nanočástic, je to evolučně perfektně vyvinuté cílení na konkrétní buněčné tkáně, vstup do buněk a transport nákladu k jádru. Výhodou liposomů je jejich stavební materiál, který je pro buňku přirozený, čímž je vyloučena toxicita pro buňky. Výhodou zlatých nanočástic je možnost jejich syntézy v širokém spektru tvarů a velikostí tak, aby bylo dosaženo optimálních vlastností nanočástice pro vstup do buňky.

Efektivita vstupu u nanočástic stejných tvarů může být ovlivněna řadou faktorů jako např. poměrem stran v daném tvaru, velikostí, ale hlavně nábojem částice. Pozitivně nabitě nanočástice vstupují do buněk snáz než nanočástice nabitě negativně. Zároveň experimenty a studie jsou prováděny na různých typech buněk a buněčných liniích. Vstup do buněk se liší jak u epitelálních a endotelových buněk, tak i u buněk zdravých a rakovinných. Důležitým faktorem je úprava povrchu nanočástic, ať už je pokryt chemikálií, či proteinovým povlakem, s čímž také souvisí, že povlak nemusí být homogenní a tím by se mohla snižovat účinnost vazby na receptor.

Porovnání efektivity a zobecnění buněčného vstupu napříč různými materiály a velikostmi nanočástic je velmi problematické, protože každá studie a konkrétní vědecká skupina provádí experimenty na jedné částici a jedné (nebo menším počtu jiných) buněčné linii, ve které se jim podaří dosáhnout efektivního vstupu.

Dle experimentálních studií však bylo zjištěno, že optimální velikost a tvar nanočástice vstupující do buňky je 50 nm velká NP s tvarem koule. Nicméně nanočástice vykazují rozdílnou efektivitu vstupu do buněk, o jejímž důvodu lze diskutovat.

V případě nanočástic tvaru tyčinek mají sice větší kontaktní plochu s povrchem buněk, když interagují svou podélnou osou, nicméně je tím snížen počet dostupných míst receptorů pro vazbu a efektivita vstupu je tedy nižší než u kulatých částic.

Rozvoj nanotechnologií v biomedicíně si pravděpodobně vyžádá další systematické studie, které pomohou identifikovat klíčové parametry pro účinný vstup nanočástic do buněk.

Vyvodit jednotný závěr pro různé nanočástice a různé buněčné linie není při současném stavu poznání pravděpodobně možné.

Seznam použité literatury

- Alaqad, K., & Saleh, T. A. (2016). Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000384>*
- Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Ralf, M.; Roberts, K.; Walter, P.: Základy buněčné biologie. 2. vydání Ústí nad Labem, Espero Publishing 2005.
- Aljabali, A. A. A., Shukla, S., Lomonosoff, G. P., Steinmetz, N. F., & Evans, D. J. (2013). CPMV DOX Delivers. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 3–10. <https://doi.org/10.1021/mp3002057>
- Araki, N., Johnson, M. T., & Swanson, J. A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of Cell Biology*, 135(5), 1249–1260.
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual Review of Immunology*, 15, 235–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.235>*
- Barza, M., Stuart, M., & Szoka, F. (1987). Effect of size and lipid composition on the pharmacokinetics of intravitreal liposomes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28(5), 893–900.
- Biabanikhankahdani, R., Alitheen, N. B. M., Ho, K. L., & Tan, W. S. (2016). pH-responsive Virus-like Nanoparticles with Enhanced Tumour-targeting Ligands for Cancer Drug Delivery. *Scientific Reports*, 6, 37891. <https://doi.org/10.1038/srep37891>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975–999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>*
- Brun, A., Bárcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J. M., ... Dixon, L. K. (2011). Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Research*, 157(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.006>*
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., ... Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>*

- Deshpande, S., Spoelstra, W. K., van Doorn, M., Kerssemakers, J., & Dekker, C. (2018). Mechanical Division of Cell-Sized Liposomes. *ACS Nano*, (2560–2568), 2560–2568. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08411>
- Dykman, L., & Khlebtsov, N. (2012). Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2256–2282. <https://doi.org/10.1039/C1CS15166E>*
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on small medicine: the state of nanomedicine products approved for use or in clinical trials. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>*
- Fenske, D. B., Chonn, A., & Cullis, P. R. (2008). Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field. *Toxicologic Pathology*, 36(1), 21–29. <https://doi.org/10.1177/0192623307310960>
- Gabizon, A., & Papahadjopoulos, D. (1988). Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(18), 6949–6953. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6949>
- Gang, H., Chang-Cheng, Y., Byoung-jin, K., S, T. R., S, F. N., T, M. C., & M, R. V. (2006). Light-Regulated Release of DNA and Its Delivery to Nuclei by Means of Photolabile Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(19), 3165–3169. <https://doi.org/10.1002/anie.200600214>
- Gao, H., Shi, W., & Freund, L. B. (2005). Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), 9469–9474. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503879102>
- Gibson, J. D., Khanal, B. P., & Zubarev, E. R. (2007). Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11653–11661. <https://doi.org/10.1021/ja075181k>
- Gómez-Hens, A., & Fernández-Romero, J. M. (2006). Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.07.006>*
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., ... West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13549–13554. <https://doi.org/10.1073/pnas.2232479100>

- Hong, R., Han, G., Fernández, J. M., Kim, B., Forbes, N. S., & Rotello, V. M. (2006). Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(4), 1078–1079. <https://doi.org/10.1021/ja056726i>
- Hošek, J. Úvod do nanotechnologie. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2010. 162. ISBN: 978-80-01-04555-8.
- Chaudhuri, A., Battaglia, G., & Golestanian, R. (2011). The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles. *Physical Biology*, 8(4), 046002. <https://doi.org/10.1088/14783975/8/4/046002>
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, 6(4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Cho, E. C., Xie, J., Wurm, P. A., & Xia, Y. (2009). Understanding the Role of Surface Charges in Cellular Adsorption versus Internalization by Selectively Removing Gold Nanoparticles on the Cell Surface with a I2/KI Etchant. *Nano Letters*, 9(3), 1080–1084. <https://doi.org/10.1021/nl803487r>
- Kartenbeck J., Stukenbrok H., Helenius A. (1989). Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 109(6), 2721–2729.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 1878–5352. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>*
- Kim, C., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2009). Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale*, 1(1), 61–67. <https://doi.org/10.1039/B9NR00112C>
- Klaessig, F. C. (2017). Nanotechnology Definitions at ISO and ASTM International: Origin, Usage, and Relationship to Nomenclature and Regulatory and Metrology Activities - Klaessig - - Wiley Online Books - Wiley Online Library 17-45.
- Klibanov Alexander L., Maruyama Kazuo, Torchilin Vladimir P., & Huang Leaf. (2001). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, 268(1), 235–237. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81016-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81016-H)
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, 89(8), 836–843. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>*

- Lin, J., & Alexander-Katz, A. (2013). Cell Membranes Open “Doors” for Cationic Nanoparticles/Biomolecules: Insights into Uptake Kinetics. *ACS Nano*, 7(12), 10799–10808. <https://doi.org/10.1021/nn4040553>
- Liu, J., & Peng, Q. (2017). Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 55, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.055>*
- Liu, X., Wu, F., Tian, Y., Wu, M., Zhou, Q., Jiang, S., & Niu, Z. (2016). Size Dependent Cellular Uptake of Rod-like Bionanoparticles with Different Aspect Ratios. *Scientific Reports*, 6, 24567. <https://doi.org/10.1038/srep24567>
- Mahanty, S., Prigent, A., & Garraud, O. (2015). Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens. *BMC Immunology*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12865-015-0095-y>*
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S. V., Keller, S., Stidwill, R. P., Hemmi, S., & Greber, U. F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *The Journal of Cell Biology*, 158(6), 1119–1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112067>
- Mercer, J., & Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology*, 11(5), 510–520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>
- Nakanishi, M., Uchida, T., Sugawa, H., Ishiura, M., & Okada, Y. (1985). Efficient introduction of contents of liposomes into cells using HVJ (Sendai virus). *Experimental Cell Research*, 159(2), 399–409. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(85\)80013-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(85)80013-6)
- Osaki, F., Kanamori, T., Sando, S., Sera, T., & Aoyama, Y. (2004). A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region. *Journal of the American Chemical Society*, 126(21), 6520–6521. <https://doi.org/10.1021/ja048792>
- Paciotti Giulio F., Kingston David G.I., & Tamarkin Lawrence. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research*, 67(1), 47–54. <https://doi.org/10.1002/ddr.20066>*
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., ... Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31(30), 7606–7619. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.051>
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377(Pt 1), 159–169. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>

- Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., ... Mailänder, V. (2015). Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. *Biomacromolecules*, 16(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00108>
- Royle, S. J. (2006). The cellular functions of clathrin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(16), 1823–1832. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5587-0>*
- Ruozi, B., Forni, F., Battini, R., & Vandelli, M. A. (2003). Cationic Liposomes for Gene Transfection. *Journal of Drug Targeting*, 11(7), 407–414. <https://doi.org/10.1080/10611860310001655600>
- Salunke, D. M., Caspar, D. L., & Garcea, R. L. (1989). Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophysical Journal*, 56(5), 887–900.
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., ... Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 8(2), 137–143. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.237>
- Sanna, V., Pala, N., & Sechi, M. (2014). Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 467–483. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36654>
- Seow, Y., & Wood, M. J. (2009). Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. *Molecular Therapy*, 17(5), 767–777. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.41>*
- Simão, A. M. S., Bolean, M., Cury, T. A. C., Stabeli, R. G., Itri, R., & Ciancaglini, P. (2015). Liposomal systems as carriers for bioactive compounds. *Biophysical Reviews*, 7(4), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0180-8>
- Suen, W.-L. L., & Chau, Y. (2014). Size-dependent internalisation of folate-decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(4), 564–573. <https://doi.org/10.1111/jphp.12134>
- Tajes, M., Ramos-Fernández, E., Weng-Jiang, X., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Eraso-Pichot, A., ... Muñoz, F. J. (2014). The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Molecular Membrane Biology*, 31(5), 152–167. <https://doi.org/10.3109/09687688.2014.937468>*
- Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., ... Yasutomi, Y. (2004). DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Therapy*, 11(7), 628–635. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302193>

- Tkachenko, A. G., Xie, H., Coleman, D., Glomm, W., Ryan, J., Anderson, M. F., ... Feldheim, D. L. (2003). Multifunctional Gold Nanoparticle–Peptide Complexes for Nuclear Targeting. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), 4700–4701. <https://doi.org/10.1021/ja0296935>
- Vácha, R., Martinez-Veracoechea, F. J., & Frenkel, D. (2011). Receptor-mediated endocytosis of nanoparticles of various shapes. *Nano Letters*, 11(12), 5391–5395. <https://doi.org/10.1021/nl2030213>
- Yang, K., & Ma, Y.-Q. (2010). Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*, 5(8), 579–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.141>
- Yi, X., & Gao, H. (2015). Cell membrane wrapping of a spherical thin elastic shell. *Soft Matter*, 11(6), 1107–1115. <https://doi.org/10.1039/C4SM02427C>
- Yue, T., Zhang, X., & Huang, F. (2015). Molecular modeling of membrane responses to the adsorption of rotating nanoparticles: promoted cell uptake and mechanical membrane rupture. *Soft Matter*, 11(3), 456–465. <https://doi.org/10.1039/c4sm01760a>
- Zeltins, A. (2013). Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>*
- Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., ... Wan, S. (2013). Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials*, 34(19), 4632–4642. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.017>
- Zhang, L. F., Zhou, J., Chen, S., Cai, L. L., Bao, Q. Y., Zheng, F. Y., ... Frazer, I. H. (2000). HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine*, 18(11), 1051–1058. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00351-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00351-5)
- Zhang, S., Gao, H., & Bao, G. (2015a). Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS nano*, 9(9), 8655–8671. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03184>
- Zhang, S., Li, J., Lykotrafitis, G., Bao, G., & Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *Advanced Materials*, 21(4), 419–424. <https://doi.org/10.1002/adma.200801393>*
- Zhao Yongfeng, Sultan Deborah, Detering Lisa, Cho Sangho, Sun Guorong, Pierce Richard, ... Liu Yongjian. (2013). Alloyed Gold Nanoparticles for Cancer Imaging: Improved Radiolabel Stability and Diagnostic Accuracy. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(1), 156–159. <https://doi.org/10.1002/anie.201308494>

Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.002>

Sekundární zdroje označeny *

Internetové zdroje obrázků

obr.č. 1 A:

virology.ws/wp-content/uploads/2010/04/sv40-298x300.jpg

obr.č. 1 C:

3c1703fe8d.site.internapcdn.net/newman/csz/news/800/2011/nanogold11particle.jpg

obr.č. 2:

<http://biopharma-asia.com/wp-content/uploads/2014/11/Fig14.jpg>

obr. č. 4:

<https://da.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/the-plasma-membrane/a/structure-of-the-plasma-membrane>