

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Fyziologie



**Mgr. Markéta Křivánková**

**Biologické vlastnosti kontrastních látek pro nádorovou diagnostiku na bázi polysacharidů**

Biological characteristics of polysaccharide based contrast agents for cancer diagnostics

**Disertační práce**

**Školitel: doc. Ing. Daniel Jiráček, PhD.**

Praha 2022



**Prohlášení:**

Jménem všech spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Markéta Křivánková (rozená Jirátová) podstatně přispěla ke všem publikacím, jež jsou nedílnou částí této disertační práce. U publikací, kde je první autorkou, se aktivně podílela na přípravě a provedení všech experimentů, analýze dat, interpretaci výsledků a přípravě manuskriptů.

V Praze, \_\_\_\_ . \_\_\_\_ .2022

.....

Doc. Ing. Daniel Jirák, PhD., školitel

**Prohlášení:**

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

V Praze \_\_\_\_ . \_\_\_\_ .2022

.....

Mgr. Markéta Křivánková

## **Identifikační záznam**

KŘIVÁNKOVÁ, Markéta. Biologické vlastnosti kontrastních látek pro nádorovou diagnostiku na bázi polysacharidů [Biological characteristics of polysaccharide based contrast agents for cancer diagnostics]. Praha, 2022. 162 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta / Institut klinické a experimentální medicíny, Pracoviště radiodiagnostiky a intervenční radiologie. Školitel Jirák, Daniel.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ing. Danielovi Jirákovi, PhD. za věnovaný čas, cenné rady, odborné vedení doktorského projektu i neformální přístup. Můj dík patří i doc. Mgr. Martinu Hrubému, PhD., Dsc a RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za pomoc v průběhu doktorského projektu. Dále děkuji také všem kolegům z oddělení ZRIR a celého IKEM. Ráda bych specificky poděkovala Mgr. Lucii Straňavové, PhD. za sarkatistické pesimisticko optimistické PhD. debaty; Mgr. Soně Kauerové, PhD., RNDr. Kateřině Zemánkové, PhD. a Mgr. Tereze Dusilové za mnohé chvíle plné smíchu na cestách i doma. Také Mgr. Andree Gálisové, PhD. za vytváření skvělého pracovního prostředí, neskutečné pracovní nasazení, nadšení pro vědu a čajové dýchánky. Velké díky patří také mé rodině (jmenovitě tatškovi, mamce, babičce, bráchovi s Natálií), přátelům (všem z řad horolezců i nehorolezců, jmenovitě zvláště Markét S., Áje N., Láďovi T., Romanovi M., Filipovi N., Ilonce V., Šárce O., Janče T. i dalším, hlavně Barče R. za nadšení pro jazykové korektury, ikdyž biologie není jejím oborem) a samozřejmě i mému manželovi (i tchánovi a tchýni). Všem zmíněným děkuji za jejich nedocenitelnou pomoc, podporu a trpělivost (za tu především).



## Abstrakt

I přes veškerý pokrok v léčbě nádorových onemocnění, který proběhl v uplynulých letech, je stále nutné ve výzkumu účinnějších a specifitějších léčiv pokračovat. V posledních letech je na vzestupu zájem o personalizovanou medicínu a její uplanění skrze nosiče léčiv (drug delivery systémy), které by mohly pomoci se zvýšením specifity léčby nádorových onemocnění a následně i účinnosti.

Drug delivery systémy mohou využívat různých platform pro svoji konstrukci, ať už jde o liposómy, micely, nanokrystaly či jiné. Velmi zajímavou platformu pro konstrukci drug delivery systémů představují polysacharidy, které byly, jakožto nosiče kontrastních látek s cílem efektivního zobrazení nádorů, charakterizovány v této disertační práci. Polysacharidy jsou zajímavé z více důvodů. Jednak svojí dostupností, dále také svojí biokompatibilitou a netoxickým charakterem. V této disertační práci se zabýváme dvěma typy polysacharidových konjugátů s navázanými kontrastními látkami pro magnetickou rezonanci a fluorescenční zobrazování. Prvním typem polysacharidu je glykogen, druhým pak manan. Oba konstrukty, jak glykogenový, tak i mananový, byly nasyntetizovány ve verzi s i bez polymetyloxazolinu, který by měl prodloužit jejich cirkulaci v organismu. Oba typy polysacharidových konjugátů využívaly pasivního cílení do nádoru pomocí efektu zvýšené propustnosti a zadržování (Enhanced Permeability and Retention effect, EPR). Mananový konjugát byl cílen pasivně pomocí EPR i aktivně přes DC-SIGN (Dendritic Cell - Specific Intercellular adhesion molecule 3 - Grabbing Nonintegrin binding receptor) receptory do sentinelových lymfatických uzlin, kde se nejčastěji objevují první metastatické nádorové buňky.

V disertační práci bylo použito rozličných metod pro in vitro a in vivo charakterizaci obou typů polysacharidových konjugátů. Lokalizace konjugátů byla sledována pomocí konfokální mikroskopie, dále byly provedeny testy cytotoxicity, testy k určení typu endocytózy, který je používán buňkou pro externě podaný glykogen. Byla charakterizována i rychlost relaxace konjugátů či míra fluorescence fantomů in vitro. Po provedených in vitro testech následovaly pilotní in vivo experimenty na nenádorových modelech. Finálně byly pro oba typy polysacharidových konstruktů, glykogenového i mananového, provedeny rozsáhlá in vivo měření u zvířat s nádory, kde se pomocí magnetické rezonance (magnetic resonance imaging, MRI) a fluorescence sledovala biodistribuce a akumulace konstruktů v závislosti na míře modifikace polymetyloxazolinem, porovnávali jsme konstrukty bez a s navázaným

polymetyloxazolinem. Na konci experimentů byly provedeny i histologická vyšetření pro určení vlivu podaných konjugátů na vnitřní orgány.

Z výsledků vyplynulo, že na glykogenu i na mananu založené konjugáty jsou velice slibnou platformou pro budoucí využití jako nosiče léčiv. Zejména díky svému netoxickému charakteru a v případě mananu i kvůli aktivnímu cílení skrze DC-SIGN receptory. Bylo také zjištěno, že úpravou míry modifikace polymetyloxazolinem lze vlastnosti obou konjugátů měnit tak, aby bylo dosaženo optimálních výsledků, tedy poměru míry akumulace v nádoru k délce cirkulace v oběhu.



## Abstract

Despite all the progress made in the treatment of cancer in recent years, it is still necessary to continue with the research of more effective and specific drugs. In recent years, there has been a growing interest in personalized medicine and its application through drug delivery systems, which could help increase the specificity of cancer treatment and subsequently its effectiveness.

Drug delivery systems can use different platforms for their design, whether they are liposomes, micelles, nano crystals or others. A very interesting platform for the construction of drug delivery systems are polysaccharides, which were, as carriers of contrast agents in order to effectively display tumours, characterized in this doctoral thesis. But polysaccharides are interesting for more reasons. Both by its availability, and by its biocompatibility and non-toxic character. In this doctoral thesis we deal with two types of polysaccharides conjugates with linked contrast agents for magnetic resonance and fluorescent imaging. The first type of polysaccharide is glycogen, the second is mannan. Both constructs - glycogen and mannan based, were synthesized in a version with and without polymethyloxazolin, which should prolong their circulation in the organism. Both types of polysaccharide conjugates used passive targeting into the tumour using the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect. Mannan conjugate was passively targeted through EPR and actively via DC-SIGN (Dendritic Cell - Specific Intercellular adhesion molecule 3 - Grabbing Nonintegrin binding receptor) receptors into the sentinel lymph nodes, where the first metastatic tumour cells are most commonly found.

The doctoral thesis used various methods for *in vitro* and *in vivo* characterization of both types of polysaccharide conjugates. The localization of conjugates was monitored by confocal microscopy, the level of cytotoxicity of the conjugates was tested, and tests for determination the type of endocytosis used by the cell for externally administered glycogen were performed. The rate of relaxation of conjugates or fluorescence of phantoms *in vitro* was also characterized. *In vitro* tests were followed by pilot *in vivo* experiments on non-tumour models. In final phase, for both types of polysaccharide constructs, glycogen and mannan based, extensive *in vivo* measurements were made on animals with tumours, where magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence were used to monitor biodistribution and accumulation of constructs according to the extent of modification of polymetyloxazolin, we compared constructs without and with linked

polymetyloxazolin. At the end of the experiments, histological examinations were also performed to determine the effect of the conjugates administered on the internal organs.

The results showed that glycogen and mannan-based conjugates are a very promising platform for future use as carriers of drugs. Especially due to its non-toxic character and in the case of mannan also due to active targeting via DC-SIGN receptors. It was also found that by adjusting the degree of modification by polymetyloxazoline, the properties of both conjugates can be changed to obtain optimal results, i.e., the ratio of the rate of accumulation in the tumour to the duration of circulation.

# Obsah

1	Seznam zkratk	4
2	Literární přehled	6
	2.1 Nádorová onemocnění	6
	2.1.1 Sentinelové lymfatické uzliny a metody jejich vyšetření	9
	2.1.2 Nádorové modely ve výzkumu	10
	2.1.2.1 Syngenní modely	11
	2.1.2.2 Xenograftové modely	11
	2.1.2.3 Humanizované modely	12
	2.2 Teranostika jako nový směr v biomedicíně	13
	2.2.1 Drug delivery systémy	14
	2.2.2 Cílená doprava léčiv do nádoru	15
	2.2.2.1 EPR efekt	15
	2.2.2.2 Aktivní cílení do nádorů	16
	2.3 Polysacharidy v biomedicíně	17
	2.3.1 Glykogen	17
	2.3.2 Manan	18
	2.4 Zobrazovací metody v diagnostice nádorů	19
	2.4.1 Zobrazování pomocí magnetické rezonance	19
	2.4.2 <i>In vivo</i> fluorescence	20
	2.4.3 Multimodální zobrazování	20
3	Cíle práce	23
4	Seznam vlastních publikací	25
	4.1 Seznam použitých publikací	25
	4.2 Seznam ostatních publikací	25
5	Materiály a metody	27
	5.1 Chemické metody	27
	5.1.1 Syntéza konjugátů na bázi glykogenu	27
	5.1.2 Syntéza konjugátů na bázi mananu	27
	5.1.3 Shrnutí variant testovaných glykogenových a mananových konjugátů	28
	5.2 Biologické metody	29
	5.2.1 Buněčné linie a jejich subkultivace	29
	5.2.2 Konfokální mikroskopie	30

5.2.3	Testy cytotoxicity a viability <i>in vitro</i> .....	30
5.2.4	Inhibice internalizace <i>in vitro</i> .....	31
5.2.5	Zvířecí modely a indukce nádorů .....	32
5.2.6	MRI polymerních konjugátů a spektroskopie .....	32
5.2.7	Fluorescenční zobrazování <i>in vivo</i> .....	33
5.2.8	MRI <i>in vivo</i> .....	34
5.2.9	Histologie .....	35
5.2.10	Statistická analýza .....	35
6	Výsledky .....	37
6.1	Biologická charakterizace nového hybridního kopolymeru na bázi glykogenu .....	37
6.2	Konjugáty na bázi mananu jakožto platforma pro multimodální zobrazování lymfatických uzlin .....	45
6.3	Glykogen jakožto výhodný polymerní nosič v nádorové theranostice: přímý <i>in vivo</i> důkaz .....	52
6.4	Nanodiagnostické látky na bázi mananu pro cílení sentinelových lymfatických uzlin a nádorů .....	62
7	Diskuse .....	71
7.1	Glykogenové konjugáty .....	71
7.2	Mananové konjugáty .....	77
8	Závěry .....	81
9	Životopis autorky disertační práce .....	82
10	Reference .....	85
11	Přílohy .....	102



# 1 Seznam zkratek

Zkratka	Český význam	Anglický význam
ALT	Alaninaminotransferáza	Alanine aminotransferase
AST	Aspartátaminotransferáza	Aspartate aminotransferase
CNR	Poměr kontrastu k šumu	Contrast to Noise Ratio
CT	Výpočetní tomografie	Computed Tomography
DC-SIGN	Intracelulární adhezní molekula držící neintegrin specifická pro dendritické buňky	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DMEM	Dulbeckem modifikované Eaglovo médium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOTA	Tetraazacyklododekan tetraoctová kyselina	Dodecane Tetraacetic Acid
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Proces epiteliálně mezenchymální tranzice	Epithelial-Mesenchymal Transition
EPR	Zvýšená propustnost a zadržování	Enhanced permeability and retention
FBS	Fetální bovinní sérum	Fetal bovine serum
FL	Fluorescence	Fluorescence
FLI	Fluorescenční zobrazování	Fluorescence imaging
GG	Glykogen	Glycogen
GG	GG-GdDOTA-IR800CW	GG-GdDOTA-IR800CW
GM	Gadoterate Meglumine (= Dotarem)	Gadoterate Meglumine (= Dotarem)
GOX	GG-GdDOTA-PMeOx-IR800CW	GG-GdDOTA-PMeOx-IR800CW
HER2	Receptor lidského růstového epidermálního faktoru 2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HSC	Kmenové buňky krvetvorby	Hematopoietic Stem Cell
IC <sub>50</sub>	Poloviční maximální inhibiční koncentrace	Inhibition Concentration for 50% inhibition
MBCD	Metyl-β-cyklodextrin	Methyl-β-CycloDextrin
MEM	Minimální esenciální médium	Minimum Essential Medium

MN	Manan	Mannan
MN	MN-DOTAGd-IR800	MN-DOTAGd-IR800
MNOX	MN-PMeOx-DOTAGd-IR800	MN-PMeOx-DOTAGd-IR800
MR	Magnetická rezonance	Magnetic Resonance
MRI	Zobrazování magnetickou rezonancí	Magnetic Resonance Imaging
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NHS	N-Hydroxysukcinimid	N-HydroxySuccinimide
PBMC	Mononukleární buňky z periferní krve	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Fosfátový pufr	Phosphate Buffered Saline
PDX	Xenograft z patientského vzorku	Patient Derived Xenograft
PEG	Polyetylenglykol	PolyEthylene Glycol
PEO	Polymer ethylenoxidu	PolyEthylene Oxide
PET	Pozitronová emisní tomografie	Positron Emission Tomography
POX	Poly(2-metyl-2-oxazolin)	Poly(2-methyl-2-OXazoline)
RARE	Rychlá akvizice se zvýšenou relaxací	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
ROI	Oblast zájmu	Region Of Interest
RPMI	Médium vytvořené v Institutu památky Roswella Parka	Roswell Park Memorial Institute medium
SLN	Sentinelová uzlina	Sentinel Lymph Node
SNR	Poměr signálu k šumu	Signal-to-Noise Ratio
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie	Single-Photon Emission Computed Tomography
TE	Echo čas	Time to Echo
TF	Turbo faktor	Turbo Factor
TR	Čas mezi jednotlivými pulsy	Time to Repetition
VEGFR	Receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

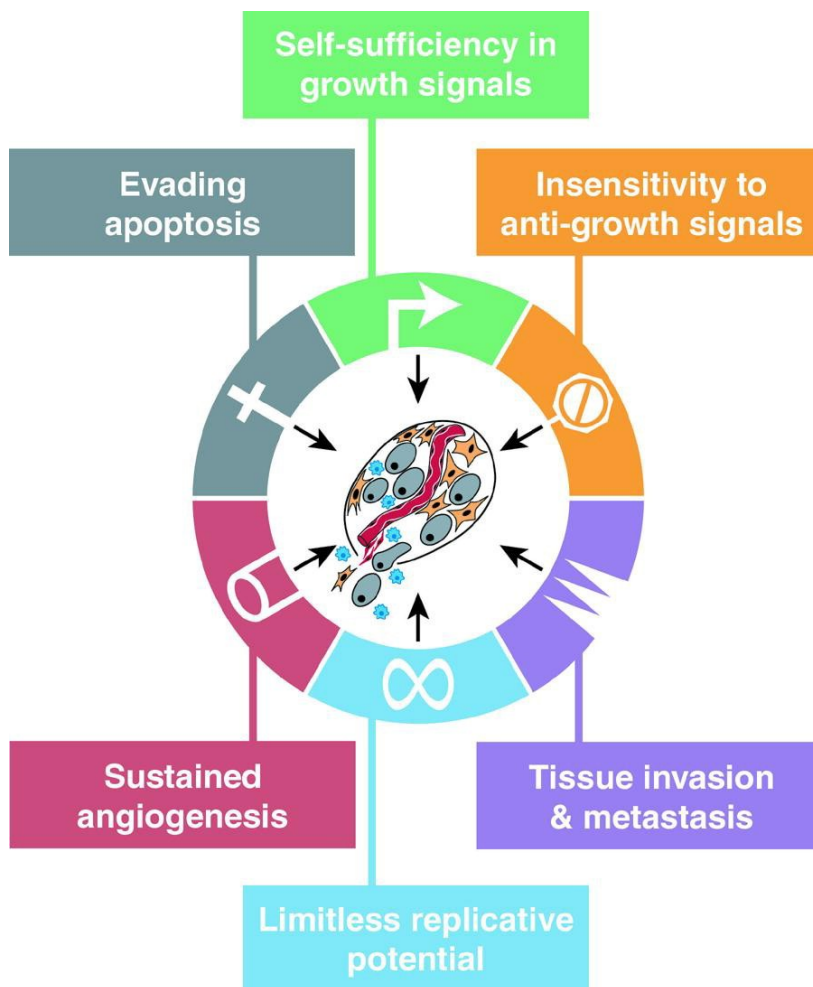
## 2 Literární přehled

### 2.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin předčasných úmrtí (Dyba et al., 2021; Nagai and Kim, 2017). Zejména vyspělé státy, či státy s vyšším HDP, jsou na čele statistik incidence nádorových onemocnění (Torre et al., 2016). Konkrétně pak v Evropě bylo v roce 2012 zaznamenáno 25 % z celkového počtu rakovinných onemocnění, byť představuje pouze 9 % světové populace (Ferlay et al., 2015; “World Population Prospects,” 2017).

Rakovina je označení pro soubor poměrně rozličných onemocnění, které spojuje to, že proběhlo několik změn genomu buněk a z původně normálních, zdravých a tělu vlastních buněk se staly buňky nádorové. Jedním z hlavních problémů ve vývoji účinné léčby nádorových onemocnění je jejich vysoká komplexnost a zároveň široká variabilita mezi jednotlivými typy, a to i v rámci nádorového onemocnění stejné tkáně. Nicméně v roce 2000, v dnes již kultovním článku „The Hallmarks of Cancer“ od Hanahan a Weinberg, bylo charakterizováno šest základních změn ve fyziologii zdravých buněk tak, aby se z nich postupným procesem získávání těchto odlišných vlastností staly buňky maligního nádoru. Mezi tyto získané vlastnosti byla zařazena soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům o zástavě růstu, invaze do tkání a metastázy, nekonečný potenciál replikace, zajištěná angiogeneze a únik apoptóze (Obrázek 1) (Hanahan and Weinberg, 2000). V roce 2011 byly k těmto šesti základním charakteristikám přidány ještě čtyři další charakteristiky rozdělené do dvou subkategorií (Obrázek 2). V první subkategorii, označované jako vlastnosti umožňující vývoj nádoru, jde za prvé o nestabilitu genomu a mutace, a dále pak o tumorem iniciovanou zánětlivou odpověď. V druhé subkategorii tzv. objevujících charakteristik je zahrnuta deregulace buněčného energetického metabolismu a únik od eliminace imunitním systémem (Hanahan and Weinberg, 2011).

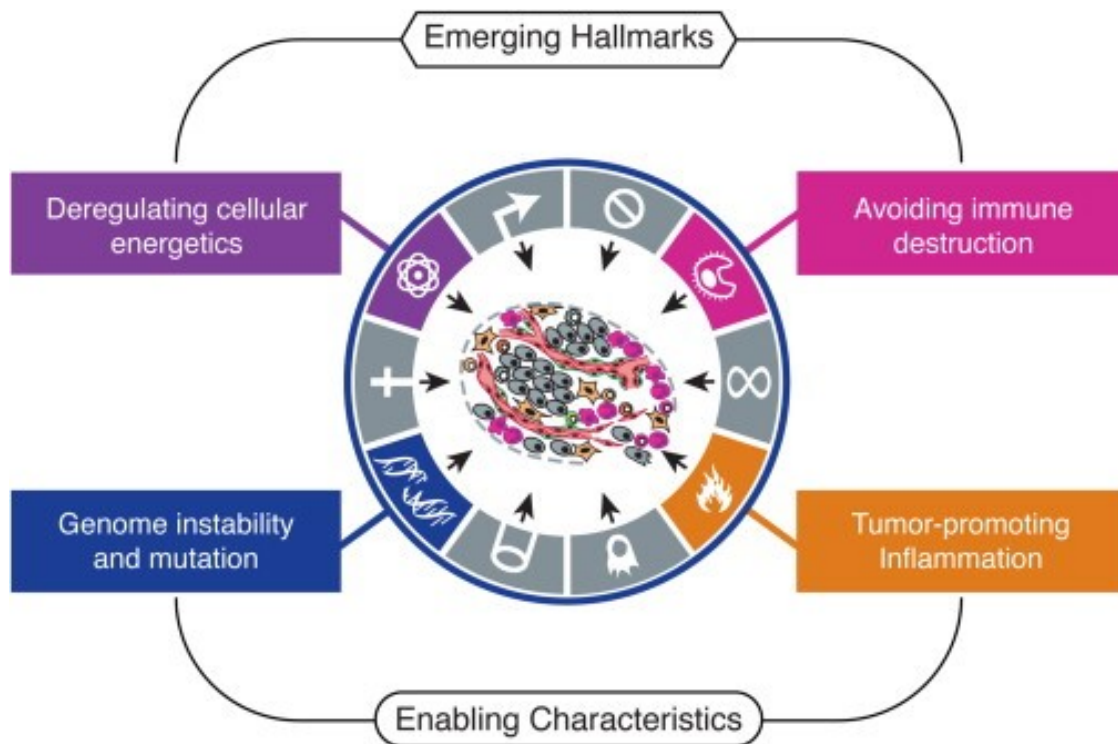




**Obrázek 1** Původní schéma vlastností, které získají normální buňky při přeměně v buňku nádorovou. Jde o vlastnosti či události, které ve svém důsledku vedou k tvorbě a přežívání maligního nádoru. Mezi šest původních schopností maligních nádorových buněk patří: soběstačnost v produkci růstových signálů (*self-sufficiency in growth signals*), necitlivost k signálům o zástavě růstu (*insensitivity to anti-growth signals*), invaze do tkání a metastázy (*tissue invasion & metastasis*), nekonečný potenciál replikace (*limitless replicative potential*), zajištěná angiogeneze (*sustained angiogenesis*) a únik apoptóze (*evading apoptosis*). Převzato z (Hanahan and Weinberg, 2000).

Pokud se blíže podíváme na první subkategorii nově rozšířených tzv. „hallmarks of cancer“ a jejich příspěvek k postupné přeměně normálních buněk v buňky nádorové, tak role nestabilního genomu je celkem intuitivní. Nestabilní genom produkuje náhodné mutace, které vedou k dalším změnám a vývoji tumorů. Naproti tomu role zánětlivé odpovědi tolik intuitivní není, nicméně právě zánět může poskytovat nádorovému mikroprostředí některé důležité molekuly (například růstové faktory), dále mohou zánětlivé buňky produkovat reaktivní metabolity kyslíku, které přispívají k mutacím okolních nádorových buněk (Hanahan and Weinberg, 2011).

V druhé subkategorii charakteristik je zmíněna deregulace energetického metabolismu. Tento poznatek není ničím novým. Naopak pochází již z poloviny dvacátého století, kdy bylo popsáno, že nádorové buňky používají glykolýzu pro produkci ATP i v aerobním prostředí, přestože je méně efektivní a má nižší produkci ATP (Warburg, 1956a, 1956b, “Warburg report on the metabolism of tumors,” 1930). Nicméně intermediáty glykolýzy mohou být využity v biosyntetických drahách, které jsou pro rychle rostoucí nádory obzvláště důležité.



**Obrázek 2** Rozšířené schéma vlastností, které získají normální buňky při přeměně v buňku nádorovou. K šesti původním vlastnostem maligních nádorových buněk, které jsou: soběstačnost v produkci růstových signálů (*self-sufficiency in growth signals*), necitlivost k signálům o zástavě růstu (*insensitivity to anti-growth signals*), invaze do tkání a metastázy (*tissue invasion & metastasis*), nekonečný potenciál replikace (*limitless replicative potential*), zajištěná angiogeneze (*sustained angiogenesis*) a únik apoptóze (*evading apoptosis*); byly přidány dvě subkategorie a v každé z nich další dvě charakteristiky. Jde o subkategorii vlastností umožňující vývoj nádoru (*enabling characteristics*), kam spadá nestabilita genomu a mutace (*genome instability and mutation*) a dále pak o tumorem iniciovaná zánětlivá odpověď (*tumor-promoting inflammation*). Druhou subkategorii jsou tzv. objevující se charakteristiky mezi něž patří deregulace buněčného energetického metabolismu (*deregulating cellular energetics*) a únik od eliminace imunitním systémem (*avoiding immune destruction*). Převzato z (Hanahan and Weinberg, 2011).

Všechny zmíněné charakteristiky nezbytné pro vznik nádorové buňky mají vztah i k léčbě nádorů. Kategorie označovaná jako invaze do tkání a metastázy je obzvláště význačná, a to zejména kvůli tomu, že nejvyšší měrou přispívá k celkové mortalitě na nádorová onemocnění (Lambert et al., 2017). Metastázy jsou definované jakožto

rozšíření primárního nádoru do bližšího či vzdálenějšího druhotného místa, kde opět vznikne nádorové ložisko (Welch, D. R., 2006). V komplexním mechanismu vzniku metastáz se uplatňuje mimo jiné i proces epiteliálně-mezenchymální tranzice (epithelial-mesenchymal transition, EMT), který rakovinným buňkám poskytuje větší mobilitu a invazivnost. Ve stručnosti můžeme říct, že se jedná o přeměnu epiteliální buňky v buňku mesenchymální tak, aby byla umožněna její zvýšená motilita a následná diseminace do vzdálenějších míst z místa primárního nádoru (Lambert et al., 2017). Právě motilita je jednou ze zásadních vlastností metastatických buněk, mezi další patří inaktivita, plastičnost, schopnost měnit blízké mikroprostředí a schopnost kolonizace (Welch and Hurst, 2019). Na šíření metastatických buněk se pak podílí i lymfatické uzliny, což bude blíže popsáno v následující kapitole.

### **2.1.1 Sentinelové lymfatické uzliny a metody jejich vyšetření**

Lymfatické uzliny významnou měrou přispívají k šíření metastáz. Přestože komplexní proces vzniku a šíření metastáz zatím není zcela znám, je dobře popsáno, že k jejich šíření přispívá právě síť lymfatických cév a pomalý tok lymfy samotné. Konkrétně například prostatický a prsní maligní karcinom často metastazují srkze lymfatické cévy přidružené k nádoru (Basu et al., 2015). Nejdůležitějším místem v tomto procesu je takzvaná sentinelová lymfatická uzlina (sentinel lymph node, SLN), tedy lymfatická uzlina nacházející se nejbliže od místa nádoru. Tato její proximita k nádoru ji předurčuje k tomu, že je místem, kam se metastázy z primárního nádoru šíří nejdříve (Karaman and Detmar, 2014).

Protože se časně metastázy objevují nejdříve v SLN, využívá se k diagnostice šíření metastáz z primárního nádoru biopsie právě této uzliny (Lyman et al., 2014). Nicméně standardně klinicky využívaná biopsie SLN je stále relativně invazivní metodou, a proto se mimo ni využívá i alternativních metod pro detekci a zobrazení metastáz v SLN. Mezi tyto metody řadíme například zobrazování magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging, MRI) (Dong et al., 2018; Evertsson et al., 2017; Krischer et al., 2018), ultrazvukové vyšetření (Gonçalves et al., 2016), SPECT, fluorescenční snímání, lymfoscintigrafii apod. (Jain et al., 2009; Joseph et al., 2017). Každá z výše zmíněných metod poskytuje odlišnou hloubku a preciznost informace, stejně tak jako má svá specifická omezení. Kombinace několika metod pak může zvýšit benefity a relevanci informace a zároveň omezit limitace jednotlivých použitých metod.

### 2.1.2 Nádorové modely ve výzkumu

Zvířecí modely vždy hráli zcela zásadní roli ve výzkumu nádorů a napomohly většině významných objevů. Pro výzkum nádorů se velmi často používají savčí modely jako například hlodavci (potkan, myš), opice (NHP – non-human primates) a psi. Nejčastěji používaným savčím i obecně zvířecím modelem pro výzkum nádorových mechanismů a potencionálních léčiv je laboratorní myš (Jonkers and Derksen, 2007).

Při výzkumu nádorových mechanismů se však nevyužívalo pouze na savců, potažmo hlodavců (Zeng et al., 2020). V mnoha studiích byly použity i jiné druhy zvířat. Mezi ty častěji používané se řadí *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Danio rerio* a *Gallus gallus*. *Danio rerio* a *Gallus gallus*. Tyto druhy byly, díky některým svým vlastnostem, využity především pro studium nádorové angiogeneze (Gheorghescu et al., 2015; Jagadeeshan et al., 2017). Hlavními přednostmi výše zmíněných, jiných než savčích modelů, je velmi rychlý reprodukční cyklus, nízké náklady na chov a reprodukci a především také menší etická dilemata spojená s jejich použitím pro experimenty (Giannaccini et al., 2014; Hason and Bartůněk, 2019; Kucinska et al., 2017). Avšak reprodukce výsledků a jejich následná aplikace na fungování lidského organismu může být problematická z důvodu odlišných fyziologických mechanismů i genetického pozadí, i přestože například genom *Danio rerio* má poměrně vysokou homologii s lidským genomem (Howe et al., 2013).

V této disertační práci se nicméně zaměřím na savčí, potažmo hlodavčí, modely v nádorovém výzkumu. Především na myší modely, ale stručně se budu věnovat i potkanům a jejich využití ve studiu nádorových mechanismů a vývoji léčiv.

Myš (*mus musculus*) získala dominantní pozici v nádorovém výzkumu z několika důvodů. Mezi hlavní patří snadná manipulovatelnost, relativně rychlý reprodukční cyklus, podobnost v anatomii, fyziologii a v současné době i plně sekvenovaný genom a s tím spojená možnost genetické manipulace a úprav genomu (Wege, 2018; Zeng et al., 2020). V neposlední řadě hraje svoji roli i historická návaznost na předchozí výsledky s myšími modely, které se staly skutečně dominantními, a široká dostupnost rozsáhlé škály imbredních kmenů, které mohou být vybrány na základě konkrétních požadavků zamýšleného experimentu. Přesto i u vztahování výsledků z myších modelů na lidské pacienty musíme brát v potaz mnohá omezení, především to, že myši tolerují vyšší dávky schválených i experimentálních léčiv a jejich imunitní systém není zcela totožný s imunitním systémem člověka (Haley, 2003). Některá výše zmíněná omezení mohou

být optimalizována využitím vysoce speciálních modelů, například imunodeficientních myší humanizovaných pomocí injekce hCD34<sup>+</sup> buněk nebo lidských periferních krevních mononukleárních buněk (human peripheral blood mononuclear cells, hPBMC).

V následujících podkapitolách se detailněji zaměřím na různé typy myších modelů s transplantovanými/indukovanými nádory. Další typy nádorových modelů, jako jsou spontánní nádorové modely, chemicky/fyzikálně indukované nádorové modely a geneticky podmíněné nádorové modely, nejsou součástí této disertační práce.

### **2.1.2.1 Syngenní modely**

Syngenní modely jsou založeny na injekci nádorových buněk, které pocházejí ze stejného kmene zvířecího modelu, do kterého jsou následně aplikovány (Khanna and Hunter, 2005). Pro příklad můžeme uvést 4T1 buňky nádoru mléčné žlázy, které pocházejí z kmene *Balb/c* myší a do těchto myší se také injikují pro vytvoření experimentálního nádorového modelu (“4T1 ATCC ® CRL-2539<sup>TM</sup>,” 2020). Nádorové linie využívané pro indukci nádorů v syngenních modelech obvykle pocházejí z nádorů, které byly u myší (případně potkanů) vytvořeny spontánně či za pomoci různých karcinogenů (Brown et al., 1990; Double et al., 1975; Takayama, 1968). Aplikace nádorových buněk může probíhat subkutánně, ale často se využívá i orthotopické aplikace, tedy aplikace do anatomického místa, ze kterého nádorová linie pochází. V případě linie 4T1 je to tedy myší mléčná žláza. Výhodou orthotopické aplikace je přiblížení se reálnému nádorovému mikroprostředí, a to včetně složky imunitního systému. Syngenní modely jsou totiž modely s plně funkčním imunitním systémem a mohou tak být využity v imunoonkologickém výzkumu bez potřeby další manipulace, jako je například vnášení lidského imunitního systému.

### **2.1.2.2 Xenograftové modely**

Xenograftové modely měly a stále mají významnou úlohu v základním i preklinickém výzkumu nádorů. Tento typ modelů potřebuje speciální imunodeficientní kmeny zvířat (potkanů či ve výzkumu nádorových onemocnění mnohem častěji používaných myší). Imunodeficientní zvířata jsou potřebná, protože xenograftové modely využívají lidských nádorových linií pro tvorbu tumorů. Nádorové buňky mohou být opět aplikovány subkutánně i orthotopicky, dále můžeme mít i takzvané metastatické xenograftové modely. Speciálním typem jsou pak modely s aplikovanými vzorky nádorů od reálných pacientů (patient-derived xenografts, PDX). PDX modely jsou tedy založeny

na aplikaci vzorků nádorů přímo od konkrétních pacientů a nikoli buněčných linií (Jung, 2014).

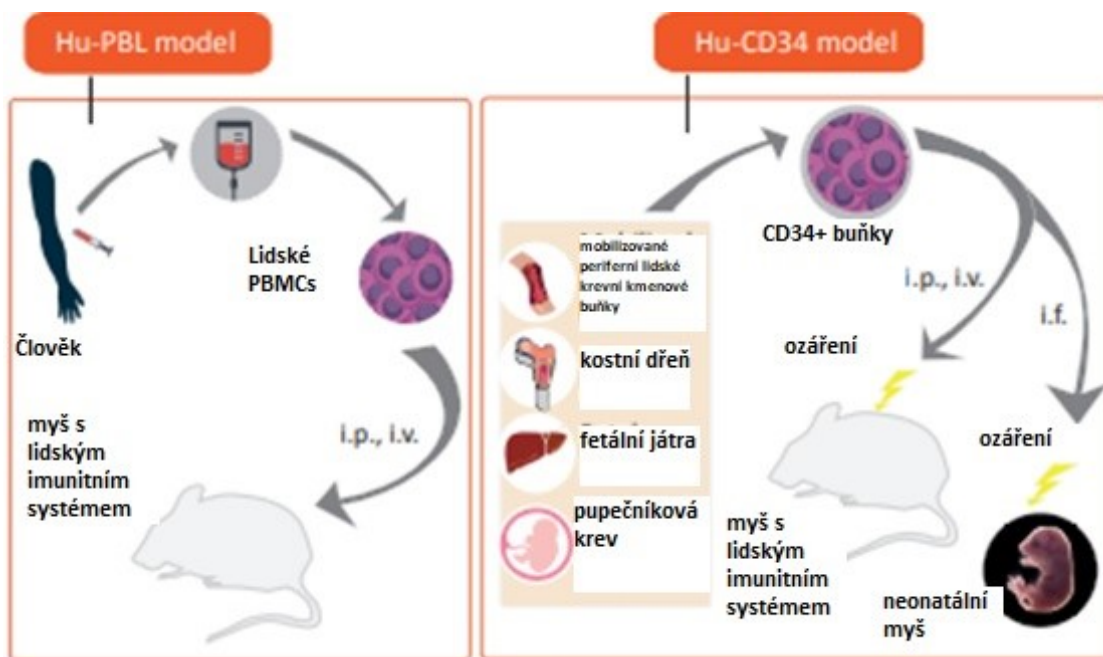
Xenograftové modely jsou stále relativně jednoduché a rychlé, co se týče jejich etablování. Přitom nám již mohou poskytnout informace, které u syngenních modelů chybí. Jde především o to, že je zde přítomná lidská genetická a epigenetická komplexita nádorů. Na druhou stranu u klasických xenograftových modelů chybí kvůli použití imunodeficientních kmenů T-buněčná odpověď, leckdy i B- a NK-buněčná odpověď, dle konkrétního použitého imunodeficientního kmene (Richmond and Su, 2008). I přes to zůstávají nezastupitelným nástrojem v preklinickém a základním výzkumu, a zaznamenaly vícero významných úspěchů v predikci klinické úspěšnosti léčiv. Pokud se porovnávala jejich schopnost predikce úspěšné léčby se skutečnými výsledky v druhé fázi klinického testování, bylo zjištěno, že jsou schopné úspěšně predikovat výsledky pro ovariální nádory a nemalobuněčné karcinomy plic (Voskoglou-Nomikos et al., 2003). Lze zmínit také úspěšnou predikci účinnosti anti-HER2 protilátky Herceptinu za pomoci xenograftových modelů. Herceptin snižoval velikost nádorů v BT-474 xenograftovém modelu sám osobě a také zvyšoval účinnost paclitaxelu a doxorubicinu, pokud s nimi byl v tomto modelu kombinován (Baselga et al., 1998).

### **2.1.2.3 Humanizované modely**

S rozvojem experimentů v oblasti imunoterapie se začalo ukazovat, že preklinické myší modely nedostatečně reflektují potřeby této specifické oblasti výzkumu. Hlavním problémem je absence imunitního systému (či jen jeho částečná přítomnost) v xenograftových modelech. Nicméně i syngenní modely nejsou zcela ideální pro výzkum imunoléčiv, protože imunitní systém u lidí a myší se vyznačuje nejen fenotypickými, ale i fyziologickými odlišnostmi (Haley, 2003). Tyto odlišnosti pak vedou k velmi malé úspěšnosti protinádorových terapeutik při přechodu z preklinických do klinických studií (Mak et al., 2014).

Řešení některých výše zmíněných problémů poskytly humanizované modely myší. V této disertační práci se zaměřím na humanizované myší modely ve smyslu imunodeficientních myší s transplantovaným lidským imunitním systémem (plným či částečným). Přestože se s prvními pokusy o transplantaci lidských tkání a imunitních buněk do imunodeficientních myší se začalo již v šedesátých letech dvacátého století (Flanagan, 1966), skutečný rozvoj těchto myších modelů byl umožněn až s vyvinutím CB17-Prkdc<sup>scid</sup> myšího kmene (Bosma et al., 1983). Tento vysoce imunodeficientní

kmen totiž umožňoval tolik potřebou transplantaci hPBMC (Mosier et al., 1988) a hematopoetických kmenových buněk (human hematopoietic stem cell, HSC či hCD34<sup>+</sup> buňky) (Lapidot et al., 1992) pro tvorbu částečně či plně funkčního vneseného lidského imunitního systému. Vývoj těchto modelů tedy umožnil testování imunoléciv v alespoň částečně rekonstruovaném lidském imunitním systému (Obrázek 3).



**Obrázek 3** Schéma tvorby myších modelů. V levé části schéma tvorby myšního modelu pomocí lidských PBMC (Hu-PBL model), v pravé části schéma tvorby myšního modelu s plně funkčním lidským imunitním systémem (Hu-CD34 model). Upraveno dle (De La Rochere et al., 2018).

## 2.2 Teranostika jako nový směr v biomedicíně

Teranostika je pojem i obor složený ze dvou částí, a to terapie a diagnostiky. Snaží se tedy o kombinaci terapeutické látky s diagnostickou tak, aby bylo možné terapeutický efekt sledovat v reálném čase a léčbu přizpůsobovat. Teranostika spadá i do personalizované medicíny, která usiluje o maximalizaci terapeutického účinku a minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků díky specificky přizpůsobené léčbě dle konkrétního pacienta a nádoru. Personalizovaná medicína se snaží o překonání limitů aktuální standardní léčby nádorů, někdy označované jako „one-fits-all“, což můžeme volně přeložit jako „jedna léčba pro všechny“. Teranostika může být tedy pro personalizovanou medicínu velkým přínosem, nicméně musí být splněna kritéria jako je netoxický a biokompatibilní charakter teranostik, jejich úspěšná akumulace v nádoru

(často za přispění aktivního cílení) a také zobrazovací modalita musí být na stejné molekule jako léčivo, aby diagnostika mohla probíhat bez časové prodlevy (Jackson and Chester, 2015; Li et al., 2017; Ryu et al., 2014). V tomto ohledu mohou být prospěšné drug delivery systémy a polymerní nosičové systémy, kde lze snadno kombinovat více zobrazovacích modalit spolu s léčivem a případně specificky cílícím ligandem.

### 2.2.1 *Drug delivery systémy*

Drug delivery systémy jsou charakterizovány jako systémy určené pro cílenou dopravu léčiv. Jejich obvyklá velikost se pohybuje v řádech nanometrů. Mezi hlavní výhody využití drug delivery systémů v léčbě či diagnostice můžeme zařadit především cílenou akumulaci v místě určení a s tím spojené omezení nežádoucích vedlejších účinků ve zdravých tkáních a orgánech. Dále pak vysokou stabilitu v organismu, a s tím spojený delší čas, po který jsou přítomny v krevní cirkulaci (Blanco et al., 2015; Choi et al., 2014; Gaber et al., 2017; Kim et al., 2013; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015; Ramasamy et al., 2014; Shi et al., 2017). Drug delivery systémy se v současné době zkoumají a vyvíjejí v rozsáhlé škále variant, a to v variantách založených na konstrukci z přírodních polysacharidů, liposomálních částic či polymerních micelách, dendrimerů, nanokrystalů, lipidových částic apod. (Faraji and Wipf, 2009; Hrubý et al., 2006).

Velkou pozornost získávají drug delivery systémy založené na přírodních polysacharidech, a to zejména kvůli specifickým výhodným vlastnostem polysacharidů a jejich variabilitě. Jedná se zejména o vysoký počet reaktivních skupin, rozličné chemické složení a širokou škálu molekulových hmotností. Díky jejich přírodnímu původu je i jejich bezpečnost většinou snadno prokazatelná a toxicita minimální (Liu et al., 2008).

Například námi využívaný manan byl použit i pro cílené dopravování kódující DNA pro ovalbumin v nádorové imunoterpii. Bylo prokázáno, že na mannan návazaná kódující DNA snížila velikost EG7 nádorů u C57BL/6 myši výrazně více než, když byla aplikována samotná bez mananového nosiče (Tang et al., 2007). Dále bylo zkoumáno i využití glukomananu pro drug delivery systémy, a to ve formě pH-senzitivních micel s kurkuminem. V rámci *in vitro* experimentů bylo potvrzeno jeho pohlcování buňkami, dále jeho biokompatibilita a na pH závislé uvolňování kurkuminu. Cytotoxicita tohoto systému byla testována obdobně jako byly testovány i konjugáty v této disertační práci, tedy pomocí testu MTT na HepG2 buňkách. Zjištěná toxicita byla nízká a otestované



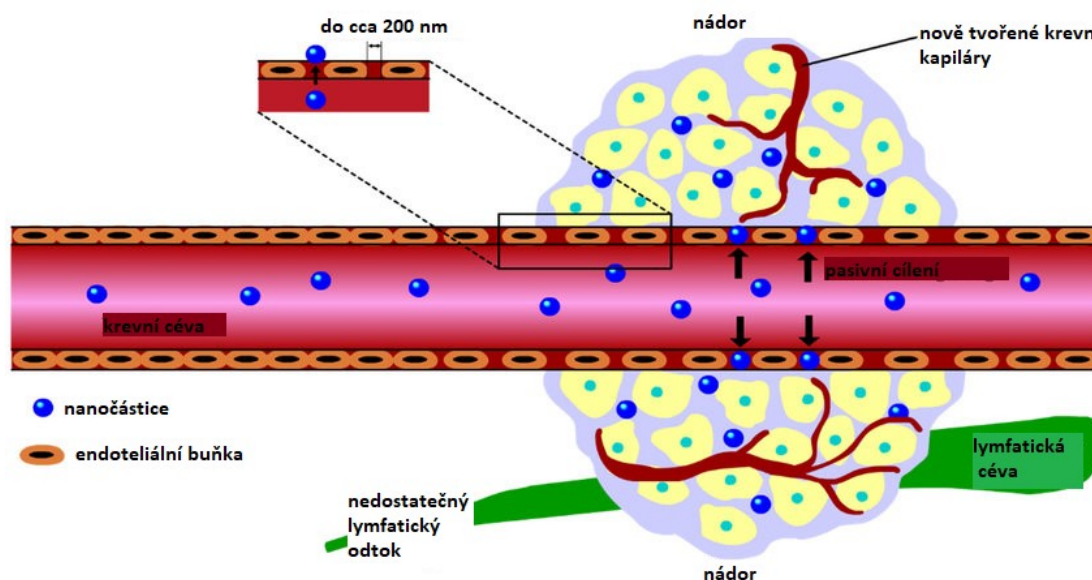
vlastnosti tedy ukazovaly na dobrý potenciál pro biomedicínské využití (Luan et al., 2017).

## 2.2.2 Cílená doprava léčiv do nádoru

Cílení drug delivery systémů, nanočástic a polymerních systémů může být v základním rozdělení dvojího typu, a to cílení pasivní neboli cílení pomocí efektu zvýšené propustnosti a zadržování (enhanced permeability and retention effect, EPR) a pak cílení aktivní, které může využívat různých ligandů ke specifickému cílení. Pasivní cílení pomáhá nanočásticím dosáhnout nádorového mikroprostředí a tam se zakonzentrovat. Aktivní cílení především usnadňuje specifické pohlcení nanočástice nádorovými buňkami (Bazak et al., 2015). Detailnější popis efektu EPR i aktivního cílení je v následujících podkapitolách.

### 2.2.2.1 EPR efekt

Efekt EPR byl poprvé popsán v roce 1986 (Matsumura and Maeda, 1986). Vzniká kombinací dvou fenoménů, a to tvorbou vysoce propustných nových cév v nádoru a zároveň velice omezeným lymfatickým odtokem z nádoru (Obrázek 4) (Fang et al., 2011; Taurin et al., 2012). Tvorba nových cév je pro nádor nezbytná. Bez nového kapilárního zásobení upadá nádor do dormantního stádia (Folkman, 1971; Folkman et al., 1971). Fenestrace v nových cévách i absence bazální membrány (Bertrand et al., 2014) jsou způsobeny rychlou novotvorbou cév. Všechny tyto aspekty pak efektu EPR napomáhají.



Obrázek 4 Schéma principu efektu EPR. Upraveno dle (Day et al., 2020).

Efekt EPR je poměrně typický u různých typů solidních nádorů a vyskytuje se tedy poměrně univerzálně (Fang et al., 2011; Taurin et al., 2012). Optimální velikost částic tak, aby byly pasivně akumulovány v nádoru pomocí efektu EPR je do cca 200 nm. Tyto částice tak svojí velikostí spadají do kategorie nanomateriálů/nanočástic.

V posledních letech se však objevily četné kontroverze o skutečném významu efektu EPR pro akumulaci nanočástic v nádorech. Některé studie naznačují, že velká část nanočástic je endocytována do nádoru aktivními mechanismy endoteliálních buněk (Sindhvani et al., 2020). Příspěvek efektu EPR k celkové akumulaci částic v nádoru může být také ovlivněn i fyziologickými aspekty nádoru jako například tlakem nahromaděné tekutiny (Barar and Omid, 2013; Omid and Barar, 2014). Omezeně je pak efekt EPR přítomen u málo krevně zásobených typů nádorů jako jsou nádory prostaty a pankreatu (Taurin et al., 2012). Další komplikací pro univerzální využitelnost efektu EPR je nekróza a hypoxie u rozsáhlejších nádorů (Coleman et al., 2002; Höckel and Vaupel, 2001).

#### **2.2.2.2 Aktivní cílení do nádorů**

Možností, jak aktivně zacílit léčivo či drug delivery systém do nádoru, je nepřeberné množství. Často se využívá toho, že nádorová tkáň exprimuje receptory či molekuly, které jsou buďto ve zdravé tkáni přítomné pouze v malém množství nebo se dokonce ve zdravé tkáni vůbec nevyskytují (Hrubý et al., 2006). Mezi známé příklady aktivního cílení pomocí specifických ligandů patří například cílení na HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor) receptory, PSMA (prostate specific membrane antigen) a CD20 (Bazak et al., 2015), dále také, v současné době velmi studované, cílení na tzv. inhibitory imunitní kontroly (immune-checkpoint inhibitory). Pokusy s polymerními nanočásticemi, které buď byly cílené jak pasivně, tak i aktivně na EGFR, nebo využívaly pouze pasivního cílení, ukázaly, že aktivní cílení hraje významnou roli v účinnosti těchto nanočástic. Respektive snižuje jejich  $IC_{50}$  (Clemons et al., 2018).

V této disertační práci je pro aktivní cílení zvolena afinita mananu k DC-SIGN (dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) receptorům, tato afinita je zprostředkována 3- a 4-OH skupinami na mananu (Feinberg

et al., 2007, 2001; Guo et al., 2004; Hu et al., 2018; Lepenies et al., 2013). DC-SIGN receptory se vyskytují především na povrchu na dendritických buněk a makrofágů (Ezekowitz et al., 1991; Garcia-Vallejo and Kooyk, 2013). Tyto specifické buněčné typy jsou cílenou destinací pro mananové konjugáty, respektive přítomnost těchto buněčných typů v SLN.

DC-SIGN receptory tvoří mezistupeň mezi adaptivní a vrozenou imunitou, kdy jejich úkolem je rozeznání patogenů, jejich následné pohlcení a vystavení antigenu na svém povrchu tak, aby jej prezentovaly T-buňkám. T-buňky následně spustí specifickou imunitní reakci (Ménová, 2021).

## **2.3 Polysacharidy v biomedicíně**

V poslední době zaznamenalo využití polysacharidů v biomedicíně zvýšený zájem a bylo předmětem několika studií (Basu et al., 2015; Muntimadugu et al., 2013). Je to zejména z důvodu, že polysacharidy jsou svojí strukturou vhodné pro využití jakožto nosiče léčiv či jako základní prvek pro výše zmíněné drug delivery systémy (Liu et al., 2008; Shelke et al., 2014; Zhang et al., 2013). Mezi další systémy, které mohou využívat vlastností polysacharidů, patří dopravní systémy pro geny (Azzam et al., 2002). Dále mohou být polysacharidy využity i v oblasti tkáňového inženýrství (Kutlusoy et al., 2017; Lepore et al., 2015; Naahidi et al., 2017).

Polysacharidy mohou být také využity pro přípravu diagnostických molekul (Majee et al., 2017; Odabasi et al., 2004; Pan et al., 2016). Velká část výzkumů v biomedicíně na toto téma se zabývá konkrétně diagnostikou nádorů, nicméně jsou i studie zaměřené na téma detekce SLN (Lu et al., 2019).

V této disertační práci jsme využili dvou různých typů polysacharidů, glykogenu a mananu, pro konstrukci polymerních konjugátů pro nádorovou diagnostiku (v případě mananu i diagnostiku SLN) s potencionálním budoucím využitím i jakožto nosičů léčiv. O těchto dvou typech polysacharidů bude pojednáno v následujících dvou podkapitolách.

### **2.3.1 Glykogen**

Glykogen je zásobní polysacharid, vyskytující takřka ve všech organismech, a to především v játrech a svalech. Je složen z molekul D-glukóz, které následně tvoří hypervětvenou strukturu (Tirone and Brunicardi, 2001). Tím, že se glykogen vyskytuje takřka ve všech organismech, tak je dostupný pro výzkumné účely z více různých obnovitelných zdrojů, jako je například ústřice či několik druhů rostlin (Matsui et al.,

1996; Putaux et al., 1999). První zmínky o glykogenu pochází z poloviny 19. století, kdy C. Bernard popisuje glykogen v játrech, a to jak jeho vznik, tak i význam (Bernard, 1857, 1855).

Hydrodynamický průměr glykogenu se pohybuje okolo 50 nm (Filippov et al., 2012), tato velikost ho řadí mezi nanočástice, které mohou být akumulovány pomocí efektu EPR i v nádorech s nízkou propustností (Cabral et al., 2011). Tato velikost hydrodynamického průměru glykogenu také, spolu s jeho molekulovou hmotností cca 10 MDa, zabraňuje jeho přímé eliminaci z organismu skrze renální filtraci. Práh pro renální filtraci se pohybuje okolo 9 nm a 45 kDa, tedy hluboce pod hodnotami, kterými disponuje molekula glykogenu, proto musí být glykogen před eliminací pomocí renální filtrace degradován na jednotlivé molekuly D-glukózy. Nutnost této degradace prodlužuje jeho poločas v cirkulaci a může být vhodně využita při designování glykogenových nosičů kontrastních látek či léčiv.

Jak bylo výše zmíněno, glykogen je přítomen takřka ve všech organismech, je tedy u lidí i zvířat plně biodegradovatelný, a to především intracelulárně, protože je relativně odolný vůči degradaci amylázami v krevní cirkulaci (Rybicka, 1996; Tirone and Brunicardi, 2001). Tyto charakteristiky poskytují glykogenu vyšší stabilitu v cirkulaci i po intravenózním podání, což je opět výhodné při využití glykogenu pro konstrukci polymerních konjugátů.

### **2.3.2 Manan**

Manany jsou známé především svým využitím v potravinářském průmyslu (Buckeridge, 2010; Edwards et al., 1992), nicméně jejich biologické funkce jsou mnohem rozmanitější (Pauly et al., 2013). V živých organismech se manan váže na manosové receptory, které spadají do třídy multilektinových receptorů. Tyto multilektinové receptory se podílejí na velmi významném propojení nespecifického a specifického (adaptivního) imunitního systému (Ferreira et al., 2010), jak již bylo zmíněno výše. Proto je i manan preferenčně akumulovaný v imunitních buňkách (Cui et al., 2003), které ve zvýšené míře exprimují DC-SIGN adhezní receptory. Výše zmíněné může podpořit ideu využití mananu jakožto nosiče pro detekci SLN a případně i míst zánětů, obojí se totiž vyznačuje vyšší koncentrací dendritických buněk a makrofágů s DC-SIGN receptory na svém povrchu. Unikátní vlastnosti mananu pro detekci lymfatických uzlin byly využity i při konstrukci CM-SPION (carboxylic mannan coated

super paramagnetic iron oxide) nanočástic, jejichž akumulace v lymfatických uzlinách byla úspěšně detekována pomocí MRI (Vu-Quang et al., 2012).

V této disertační práci byl pro veškeré syntézy a experimenty použit komerčně dostupný manan ze *Saccharomyces cerevisiae*. Tento manan se skládá z  $\alpha$ -1,6-spojených jednotek manózy v hlavním řetězci s velkým procentem postranních vazeb  $\alpha$ -1,2 a  $\alpha$ -1,3 (Yamabhai et al., 2016). Dále manan obsahuje mnoho hydroxylových skupin, společně s jeho typickou strukturou toto vede k tomu, že může být snadno modifikován tak, aby bylo dosaženo optimálních vlastností pro zamýšlené využití. Mimo modifikace umožňuje struktura mananu také konjugaci dalších molekul, v případě této disertační práce šlo o konjugaci práb sloužících pro zobrazování různými modalitami (magnetickou rezonancí a fluorescenčním zobrazováním).

Stejně jako jiné polysacharidy, je i manan biokompatibilní, biodegradabilní a netoxický a pochází z relativně levných obnovitelných zdrojů (Zia et al., 2016). Degradaci mananů zajišťuje především  $\beta$ -mannanáza a  $\beta$ -manosidáza.  $\beta$ -mannanáza zajišťuje náhodnou hydrolýzu vnitřních  $\beta$ -1,4,-glykosidových vazeb mananů.  $\beta$ -manosidáza je enzymem, který odštěpuje manózy z neredukujícího konce mananů (Moreira and Filho, 2008; Yamabhai et al., 2016). Oba enzymy tedy přispívají k biodegradabilitě mananu, a tedy i zlepšují jeho potenciál pro využití v biomedicíně.

## 2.4 Zobrazovací metody v diagnostice nádorů

Zobrazovací metody jsou klíčové pro včasnou diagnostiku nádorů. Jejich rozvoj značně usnadnil brzké rozpoznání nádorů, což je pro další léčbu zcela zásadní (Frangioni, 2008; Sree et al., 2010). V této disertační práci bylo využito dvou zobrazovacích technik a také jejich kombinace – tzv. multimodálního zobrazování. Jedna z těchto dvou zobrazovacích metod, magnetická rezonance (magnetic resonance, MR), je rutinně klinicky využívána. Druhá metoda, fluorescenční *in vivo* zobrazování, se řadí spíše do technik využívaných v preklinickém a základním výzkumu. Obě tyto metody budou stručně popsány v následujících kapitolách.

Mezi další techniky zobrazování patří PET (positron emission tomography, pozitronová emisní tomografie), SPECT (single photon emission computed tomography, jednofotonová emisní výpočetní tomografie), CT (computed tomography, výpočetní tomografie), ultrazvuk a bioluminiscenční zobrazování. Všechny výše zmíněné techniky zobrazování, mimo bioluminiscenční zobrazování, jsou běžně využívány v klinické praxi a každá poskytuje specifický soubor výhod a limitací.

### 2.4.1 Zobrazování pomocí magnetické rezonance

Zobrazování pomocí magnetické rezonance spadá pod anatomické metody zobrazování, nicméně existuje i specifická varianta MRI, fMRI (funkční magnetická rezonance), která se neřadí mezi metody anatomického zobrazování, ale je ve skupině funkčních zobrazovacích metod. MRI je v rutinně využívána v klinické praxi a na rozdíl od SPECT, PET či CT nezatěžuje organismus ionizujícím zářením.

Zobrazování pomocí MR využívá jádra atomů vodíku ( $^1\text{H}$  proton), který je hojně zastoupen ve všech tkáních organismů. Kontrast tkání v obraze vzniká v důsledku odlišných relaxačních časů T1 a T2 (Pautler, 2004). Výhodou MR je možnost získat různé kontrasty mezi tkáněmi nastavením parametrů měřících sekvencí, základní je T1 a T2 vážené zobrazování. V základním rozdělení jsou tedy obrazy buď T1 nebo T2 vážené. Tkáně s vysokým obsahem vody, jako je obvykle i nádorová tkáň, se jeví u T1 váženého zobrazení tmavé (nízký signál). Na T2 vážených obrazech jsou naopak světlé (vysoký signál). Veškeré tyto rozdíly jsou dány odlišnou relaxací. T1 relaxaci označujeme jako tzv. „spin-mřížka“ relaxaci, jádra atomů vodíku v tomto případě předávají energii, která byla dodaná radiofrekvenčním pulsem při excitaci, svému okolí. T2 relaxaci označujeme jako „spin-spin“, jádra atomů vodíku nepředávají pohlcenou energii okolí, ale vyměňují energii mezi sebou (Edelman and Warach, 1993; Pautler, 2004).

Základní kontrast tkání, založený na odlišném obsahu vody a vzniklý v důsledku odlišných relaxačních časů T1 a T2 (Pautler, 2004), jak bylo zmíněno výše, může být zvýšen za pomoci kontrastních látek. Kontrastní látky pro MR lze rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie se řadí paramagnetické látky, jako jsou lanthanoidy. Tyto látky snižují T1 relaxaci, důsledkem je světlejší signál. Druhou kategorií představují superparamagnetické nanočástice například nanočástice superparamagnetických oxidů železa (SPION). Tyto látky neovlivňují T1 relaxaci, ale mají vliv na T2 relaxaci (Shokrollahi, 2013). V disertační práci bylo jako kontrastní látka použito gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) navázané na glykogenových a mananových konjugátech. Gadolinium je využíváno v klinické praxi a spadá do kategorie lanthanoidů a ovlivňuje tedy T1 relaxaci.

### 2.4.2 *In vivo* fluorescence

Ke snímání emise fluorescenčního signálu z fluorescenčních markerů je při zobrazování tohoto signálu *in vivo* využíváno citlivých kamer. Obecně jsou pro *in vivo* fluorescenční měření preferovány fluorescenční markery v blízkém infračerveném

spektru (Near InfraRed = NIR spektrum, 700-1000 nm) (Rao et al., 2007), protože v tomto spektru jsou nejméně akcentovány nevýhodné vlastnosti tkání zvířat, jako je pohlcování a rozptyl emitovaných fotonů. Využití fluoroforů v NIR spektru tedy zvyšuje prostupnost signálu tkáněmi. Také autofluorescence tkání je v NIR spektru nižší. Toto je zvláště důležité, protože autofluorescence tkání může zásadním způsobem negativně ovlivnit poměr měřeného signálu k pozadí. Nejvyšší autofluorescence tkání je detekovatelná v zeleném spektru, tedy po excitaci modrým světlem. V NIR spektru je autofluorescence takřka eliminována a poměr signálu k pozadí je zvýšen (Cheong et al., 1990; Frangioni, 2003; Zelmer and Ward, 2013).

Principem fluorescenčního zobrazování (Fluorescence Imaging, FLI) je excitace fluorescenčního ligandu způsobená absorpcí elektromagnetické energie (excitačním zářením určité vlnové délky) a následná emise záření o delší vlnové délce. Energie emitovaného světla je nižší než energie světla excitujícího, dochází tedy ke ztrátě energie, což je označováno jako Stokeův posun. Kompletní princip popisuje tzv. Jablonského diagram (Sanderson et al., 2014).

Fluorescenční *in vivo* zobrazování v posledních letech prošlo značným rozvojem a je ve výzkumu hojně využíváno zejména díky tomu, že je vysoce senzitivní a zároveň zcela neinvazivní (pomineme-li nutnost anestézie laboratorních zvířat). I v porovnání s bioluminiscenčním zobrazováním je fluorescenční zobrazování dostatečně senzitivní a specifické pro monitorování růstu orthotopických nádorů z linie 4T1 (Xie et al., 2012). Také další studie s 4T1 linií, která testovala polysacharidový, konkrétně celulózový, multimodální nanosystém (PET a fluorescenční zobrazování) ukázala, že je tato metoda zobrazování vhodná pro testování vyvíjených nosičů léčiv a jiných diagnostických molekul (Sarparanta et al., 2020; Xie et al., 2012).

### 2.4.3 Multimodální zobrazování

Multimodální zobrazování umožňuje dosáhnout optimálního rozlišení, senzitivity i specifity, čehož nelze docílit jedinou zobrazovací technikou. V posledních zhruba 30 letech, a zvláště pak na přelomu tisíciletí, začalo multimodální zobrazování získávat na popularitě díky obecnému rozvoji zobrazovacích technik, a zvláště pak hybridních zobrazovacích přístrojů, jako například PET/CT či PET/MRI. Idea multimodálního zobrazování je založená na snaze získat, co nejlepší obraz s co nejvyšším množstvím informace a překonat omezení jednotlivých zobrazovacích modalit, jak bylo již naznačeno v úvodu této sekce. Obecně totiž platí, že vysoce citlivé metody trpí nízkým

rozlišením, zatímco metody s vysokým rozlišením nemají tak dobrou citlivost (Burke et al., 2017; Louie, 2010).

Pro multimodální zobrazování se využívají například lipozómy s vnesenými kontrastními látkami do jejich jádra či tzv. quantum doty, které byly dříve primárně určené pro fluorescenční zobrazování (Louie, 2010). Nanočástice jsou obzvláště vhodné pro multimodální zobrazování díky jejich rozměrům a z toho vyplívající možnosti na ně navázat více zobrazovacích modalit (Burke et al., 2017). Konkrétně pak pro detekci 4T1 nádorů, případně i SLN, byly s dobrými výsledky využity například nanočástice kombinující fluorescenční zobrazování v NIR spektru a PET (Tang et al., 2012) nebo upkonverzní nanočástice kombinující MR a luminiscenční zobrazování (Cheng et al., 2012). Také  $Gd^{3+}$ , které bylo použito v této disertační práci, se využívá pro konstrukci multimodálních nanočástic. Byly syntetizovány trimodální nanočástice, kde kombinace optického, MRI a rentgenového CT zobrazování poskytuje navzájem se doplňující informace a zvyšuje, jak citlivost, tak i rozlišení při detekci této nanočástice (Shapoval et al., 2019).

Multimodální zobrazování je tedy v současné době velice atraktivní technologií poskytující naději pro lepší diagnostiku a následně i preciznější léčbu nádorů. V rámci této technologie mohou být plně využity vlastnosti nanočástic tak, aby vhodnou kombinací aktuálně preklinicky využívaných zobrazovacích modalit (PET, MRI, CT, SPECT, ultrazvuk a fluorescenční zobrazování) byly posunuty hranice současného biotechnologického výzkumu a rozvinuta oblast personalizované medicíny (Lee et al., 2012).



### 3 Cíle práce

Cílem této disertační práce byla analýza potencionálního využití polysacharidů v personalizované nanomedicině a komplexní charakteristika biologických vlastností dvou typů nových polysacharidických nanomateriálů pro jejich budoucí využití jakožto nosičů nádorových léčiv. První z polysacharidových nosičů využíval glykogenovou kostru, druhý byl založen na využití mananu.

#### **a) Charakterizovat biologické vlastnosti polysacharidových nosičů na bázi glykogenu a mananu *in vitro***

Prvním cílem byla charakterizace polysacharidových nosičů na bázi glykogenu *in vitro* před jejich aplikací do zvířecích modelů. Glykogenové konjugáty byly testovány na buněčné linii pomocí fluorescenčního zobrazování, konfokální mikroskopie, průtokové cytometrie a testů cytotoxicity. Mananové konjugáty byly testovány *in vitro* pomocí fluorescenčního zobrazování, spektroskopie, testů cytotoxicity a viability.

#### **b) Určit biologické a biofyzikální vlastnosti polysacharidových nosičů na bázi glykogenu *in vivo* ve zvířecích modelech**

Po *in vitro* charakterizaci bylo cílem aplikovat a otestovat polysacharidové nosiče na bázi glykogenu ve zvířeti bez nádoru a následně v nádorovém modelu, kde byla biodistribuce a akumulace sledována pomocí fluorescenčního zobrazování a zobrazování na magnetické rezonanci (Magnetic Resonance Imaging, MRI). Cílem bylo i ověření netoxického vlivu glykogenových konjugátů na vnitřní orgány pomocí histologie.

#### **c) Popsat distribuci a akumulaci v SLNs u nového typu mananového polymerního konstruktů v myším syngenním modelu pomocí fluorescence *in vivo* a MRI**

Dalším cílem byla charakterizace akumulace, distribuce a eliminace mananových konjugátů v myším modelu s orthotopickým nádorem. Záměrem také bylo určit vliv mananových konjugátů nejen na nádory, ale i na ostatní orgány. Zásadním úkolem v rámci tohoto cíle bylo stanovení úrovně akumulace polysacharidových nosičů na bázi mananu v SLNs.

#### **d) Stanovit vliv polymetyloxazolinu na vlastnosti polysacharidových nanomateriálů na bázi glykogenu a mananu**

Posledním cílem bylo stanovení vlivu polymetyloxazolinu na vlastnosti obou typů polysacharidických nanomateriálů. Cílem bylo určení vlivu polymetyloxazolinového roubování na akumulaci a eliminaci jednotlivých konjugátů.

## 4 Seznam vlastních publikací

### 4.1 Seznam použitých publikací

**Jirátová M**, Pospíšilová A, Rabyk M, Pařízek M, Kovář J, Gálisová A, Hrubý M, Jirák D. Biological characterization of a novel hybrid copolymer carrier system based on glycogen. *Drug Deliv Transl Res*. 2018 Feb;8(1):73-82. doi: 10.1007/s13346-017-0436-x. PMID: 29134553. **IF: 2.664**

Rabyk M, Galisova A, **Jiratova M**, Patsula V, Srbova L, Loukotova L, Parnica J, Jirak D, Stepanek P, Hruby M. Manan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *J Mater Chem B*. 2018 May 7;6(17):2584-2596. doi: 10.1039/c7tb02888a. Epub 2018 Jan 9. PMID: 32254477. **IF: 5.344**

Gálisová A, **Jirátová M**, Rabyk M, Sticová E, Hájek M, Hrubý M, Jirák D. Glycogen as an advantageous polymer carrier in cancer theranostics: Straightforward in vivo evidence. *Sci Rep*. 2020 Jun 26;10(1):10411. doi: 10.1038/s41598-020-67277-y. PMID: 32591567; PMCID: PMC7320016. **IF: 3.998**

**Jirátová M**, Gálisová A, Rabyk M, Sticová E, Hrubý M, Jirák D. Mannan-Based Nanodiagnostic Agents for Targeting Sentinel Lymph Nodes and Tumors. *Molecules*. 2020 Dec 31;26(1):146. doi: 10.3390/molecules26010146. PMID: 33396204; PMCID: PMC7795445. **IF: 3.267**

### 4.2 Seznam ostatních publikací

Herynek V, Gálisová A, Srinivas M, van Dinther EAW, Kosinová L, Ruzicka J, **Jirátová M**, Kriz J, Jirák D. Pre-Microporation Improves Outcome of Pancreatic Islet Labelling for Optical and <sup>19</sup>F MR Imaging. *Biol Proced Online*. 2017 Jun 28; 19:6. doi: 10.1186/s12575-017-0055-4. PMID: 28674481; PMCID: PMC5488379. **IF: 2.711**

Gálisová A, Fábryová E, Sticová E, Kosinová L, **Jirátová M**, Herynek V, Berková Z, Kříž J, Hájek M, Jirák D. The Optimal Timing for Pancreatic Islet Transplantation into Subcutaneous Scaffolds Assessed by Multimodal Imaging. *Contrast Media Mol Imaging*. 2017 Dec 26; 2017:5418495. doi: 10.1155/2017/5418495. PMID: 29440984; PMCID: PMC5758856. **IF: 2.934**

Lobaz V, Hladik M, Steinhart M, Paruzel A, Černoch P, Pánek J, Vetrík M, Jiráček D, **Jiráček M**, Pop-Georgievski O, Šlouf M, Garcia-Argote S, Pieters G, Doris E, Hrubý M. Tungsten (VI) based "molecular puzzle" photoluminescent nanoparticles easily covered with biocompatible natural polysaccharides via direct chelation. *J Colloid Interface Sci.* 2018 Feb 15; 512:308-317. Doi 10.1016/j.jcis.2017.10.056. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29078182. **IF: 7.489**

## 5 Materiály a metody

### 5.1 Chemické metody

#### 5.1.1 Syntéza konjugátů na bázi glykogenu

Syntéza konjugátů na bázi glykogenu vycházela z komerčně dostupného ústříčného glykogenu typu II (Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika). Tato disertační práce je zaměřena na GG-GdDOTA-Dy615, GG-PMeOx-1-Ds, GG-PMeOx-3-Ds, GG-FITC, GG-PMeOx-1-FITC, GG-GdDOTA-IR800CW (v této práci dále v sekci 6.3 referováno zkráceně jako GG), GG-GdDOTA-PMeOx-IR800CW (v této práci dále v sekci 6.3 referováno zkráceně jako GOX).

Syntéza glykogenových konjugátů začala alylací glykogenu. K derivátu obsahujícímu alylové skupiny byl přidán cysteinamin. A následně konjugován s kyselinou 1, 4, 7, 10-tetrazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctovou (NHS ester DOTA). Získaný produkt ještě prošel reakcí s chloridem gadolinia (III), aby došlo k chelaci  $Gd^{3+}$ . Po konjugaci s GdDOTA byly přidány i příslušné fluorescenční barvy (Dy615, IR800CW).

Pokud glykogenové konjugáty obsahovaly polymetyloxazolin (POX). Byl derivát obsahující alylové skupiny a cysteinamin rozpuštěn v DMSO a následně k němu byly přidány řetězce POX, získané při kationické polymerazici. Posléze proběhla opět konjugace s kyselinou 1, 4, 7, 10-tetrazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctovou (NHS ester DOTA) a reakce s chloridem gadolinia (III), pokud výsledné konjugáty měly mimo POX obsahovat i GdDOTA. Pokud ne, byly po přidání POX přidány už jen fluorescenční barvy.

Podrobnější popis syntézy jednotlivých glykogenových konjugátů lze nalézt v článcích od (Filippov et al., 2012; Jirátová et al., 2018; Pospisilova et al., 2014).

#### 5.1.2 Syntéza konjugátů na bázi mananu

Syntéza konjugátů na bázi mananu vycházela z komerčně dostupného mananu pocházející ze *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika). Byly nasyntetizovány dvě varianty mananových konjugátů.

První varianta bez polymethyloxazolinu začala alylací komerčně dostupného mananu tak, aby vzniknul derivát obsahující alylové skupiny. Následně proběhla reakce s cysteaminem, která do derivátu vnesla primární aminové skupiny. Tento manan, který

obsahoval primární aminové skupiny, byl následně konjugován s esterem N-hydroxysuccinimidu (NHS) infračervené fluorescenční barvy (NHS ester IR800CW) a také s kyselinou 1, 4, 7, 10-tetrazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctovou (NHS ester DOTA). Získaný produkt ještě prošel reakcí s chloridem gadolinia (III), aby došlo k chelaci  $Gd^{3+}$ . Výsledný produkt MN-DOTAGd-IR800 (zkráceně MN) tedy umožňoval fluorescenční (díky IR800CW) i MR (díky DOTA  $Gd^{3+}$ ) zobrazování.

Druhý mananový konjugát byl syntetizován tak, že na začátku byl manan rozpuštěn v DMSO a výsledný manan sodium alkoxid reagoval s řetězcí POX, získanými při kationické polymerizaci. Protože pro polymerizaci POX byl použit alyl bromid, výsledný mananový derivát již obsahoval alylové skupiny. Následně byl tedy tento derivát obsahující alylové skupiny modifikován stejným procesem jako výše zmíněný MN-DOTAGd-IR800CW. Finálním produktem byl MN-PMeOx-DOTAGd-IR800 (zkráceně MNOX).

Deatlnější popisy syntézy mananových konjugátů lze nalézt v publikovaných článcích (Jirátová et al., 2020; Rabyk et al., 2018).

### 5.1.3 Shrnutí variant testovaných glykogenových a mananových konjugátů

V disertační práci byly testovány různé varianty glykogenových a mananových konjugátů. Z glykogenových konjugátů byly testovány následující varianty: GG-PMeOx-1-Ds (glykogen s navázanou fluorescenční barvou Dansyl (Ds) a modifikovaný polymetyloxazolinem), GG-PMeOx-1-FITC (glykogen s navázaným fluoresceinem isothiocyanátem (FITC) a s nižším obsahem polymetyloxazolinu), GG-PMeOx-3-FITC (glykogen s navázaným fluoresceinem isothiocyanátem (FITC) a s vyšším obsahem polymetyloxazolinu), GG-GdDOTA-Dy615 (glykogen s navázanou fluorescenční barvou Dyomics 615 (Dy615) a kontrastem pro magnetickou rezonanci  $Gd^{3+}$ ), dále konjugáty označované jako GG (glykogen s navázanou fluorescenční barvou IR800CW a kontrastem pro magnetickou rezonanci  $Gd^{3+}$  bez modifikace polymetyloxazolinem) a GOX (glykogen s navázanou fluorescenční barvou IR800CW, kontrastem pro magnetickou rezonanci  $Gd^{3+}$  a modifikovaný polymetyloxazolinem).

Z mananových konjugátů byly otestovány následující varianty: MN (manan s navázanou fluorescenční barvou IR800CW a kontrastem pro magnetickou rezonanci  $Gd^{3+}$  bez modifikace polymetyloxazolinem) a MNOX (manan s navázanou fluorescenční barvou IR800CW, kontrastem pro magnetickou rezonanci  $Gd^{3+}$  a modifikovaný polymetyloxazolinem).

Jako kontrola pro MRI měření se používalo gadoteratu meglumine (GM, klinicky využívaný pod názvem Dotarem).

## 5.2 Biologické metody

### 5.2.1 Buněčné linie a jejich subkultivace

Pro *in vitro* experimenty s glykogenovými konjugáty byla použita linie HepG2 (ATCC® HB-8065™, Praha, Česká republika). Jedná se o lidskou hepatocelulární linii. Buněčná linie byla pěstována v nízkých pasážích za standardních pomínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Jakožto kultivační médium bylo použito MEM (Minimum Essential Medium) bez fenolové červeně (Gibco® by LifeTechnologies™, Paisley, UK), která by mohla vnášet nechtěný fluorescenční signál do experimentů. Médium bylo suplementováno fetálním bovinním sérem (FBS) (Gibco® by LifeTechnologies™, Waltham, MA, USA) na 10% koncentraci. Jako další suplementy kultivačního média byly použity neesenciální aminokyseliny, L-glutamine (200mM zásobní roztok) a penicilin/streptomycin (zásobní roztok o koncentraci 10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu na 1 ml), vše bylo přidáno na finální 5% koncentraci v médiu (vše Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika).

Pro indukci nádorů a následné testování glykogenových konjugátů ve zvířecím nádorovém modelu byla použita linie HUH7 (JCRB Cell Bank, Tokyo, Japonsko). Jedná se o lidskou hepatocelulární linii schopnou tvořit podkožní i orthotopické nádory u imunodeficientních zvířat. Buněčná linie byla pěstována v nízkých pasážích za standardních pomínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Jakožto kultivační médium bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bez fenolové červeně (Gibco® by LifeTechnologies™, Paisley, UK). Do média bylo přidáno FBS (Gibco® by LifeTechnologies™, Waltham, MA, USA) na 10% finální koncentraci, L-glutamine (200mM zásobní roztok, Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) na finální 5% koncentraci a penicilin/streptomycin (zásobní roztok o koncentraci 10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu na 1 ml, Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) na finální 5% koncentraci.

Pro všechny *in vivo* experimenty a většinu *in vitro* experimentů s mananovými konjugáty byla použita linie 4T1 (ATCC® CRL-2539™, Praha, Česká republika). 4T1 je linie myšího nádoru mléčných žláz, je tudíž schopná vytvářet orthotopické i podkožní nádory v imunokompetenčních myších kmene *Balb/c*. Buněčná linie byla pěstována

v nízkých pasážích za standardních pomínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) v RPMI kultivačním médiu (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco<sup>®</sup> by LifeTechnologies<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA). Médium bylo suplementováno FBS (Gibco<sup>®</sup> by LifeTechnologies<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA) na 10% finální koncentraci, L-glutaminem (200mM zásobní roztok, Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) na finální 5% koncentraci a penicilinem/streptomycinem (zásobní roztok o koncentraci 10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu na 1 ml, Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) na finální 5% koncentraci.

Pro test viability s mananovými konjugáty byly použity linie RAW 264.7, J774A.1 (Merck Ltd., Praha, Česká republika), MCF7 (LGC Standard Sp.z.o.o., Polsko) a linie 4T1, v tomto konkrétním experimentu od dodavatele LGC Standard Sp.z.o.o., Polsko. Linie byly pěstovány za standardních pomínek (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) ve výše popsaném suplementovaném RPMI kultivačním médiu (Gibco<sup>®</sup> by LifeTechnologies<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA).

### **5.2.2 Konfokální mikroskopie**

HepG2 buněčná linie byla inkubována po dobu 4 hodin s glykogenovými konjugáty (GG-PMeOx-1-Ds, GG-GdDOTA-Dy615, GG-PMeOx-1-FITC). Finální koncentrace glykogenových konjugátů byla 0.3% v inkubačním médiu. Následně byly buňky nabarveny Hoechst 33342 a LysoTrackery<sup>™</sup> (vše Invitrogen<sup>™</sup>, LifeTechnologies, Praha, Česká republika), barvení probíhalo dle doporučení výrobce. Po nabarvení byly HepG2 změřeny na konfokálním mikroskopu Leica SP2 AOBS (objektiv: HCX PL APO CS 63.0 × 1.20 W CORR). V případě, že byly buňky inkubovány s přídavkem glukózy, byla finální koncentrace glukózy (Sigma-Aldrich Ltd., Praha, Česká republika) 22 mM v inkubačním médiu a tato koncentrace byla použita i po celou dobu barvení a preinkubace s glykogenovými konjugáty.

### **5.2.3 Testy cytotoxicity a viability *in vitro***

Cytotoxicita glykogenových konjugátů byla otestována pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testem dle standardního protokolu (Freshney, 2011). Otestovány na HepG2 buňkách byly GG-PMeOx-1-FITC, GG-GdDOTA-Dy615 a čistý GG, ze kterého se konjugáty syntetizovaly, maximální testovaná koncentrace byla 0.6% v médiu. Absorbance byla měřena na Multi-Mode



readeru (Synergy™ 2, BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Testování probíhalo v oktaplikátech.

Mananové konjugáty byly také otestovány pomocí MTT testu. Test byl proveden na 4T1 buňkách v tetraplikátech a nejvyšší použitá koncentrace byla pro MN i MNOX 4.5 mM Gd<sup>3+</sup> v použitých polymerních konjugátech. Reagencie i Multi-Mode reader (Synergy™ 2, BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, USA) byly stejné jako pro testování glykogenových konjugátů.

S mananovými konjugáty byl proveden i test viability na RAW 264.7, J774A.1, 4T1 a MCF7 buňkách. RAW 264.7 a J774A.1 byly nasazeny do 96 jamkové destičky s plochým dnem v počtu  $8 \times 10^3$  buněk na 100  $\mu$ l kultivačního média (v jedné jamce), 4T1 a MCF7 pak v počtu  $5 \times 10^3$  buněk na 100  $\mu$ l kultivačního média (v jedné jamce). Po 24 hodinách inkubace za standardních podmínek (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) byly k buňkám na 72 hodin přidány mananové konjugáty (MN nebo MNOX) v koncentracích v rozmezí 0.004 -0.5 mg/ml inkubačního média. Po 72 hodinách inkubace s MN nebo MNOX byla viabilita buněk měřena pomocí Alamar Blue (ThermoFisher Scientific, Praha, Česká republika). Jakožto kontrola (vynesená jako 100 % viability) byly vždy použity buňky příslušné linie bez přidaného mananového konjugátu. Test viability byl proveden v triplikátech.

#### **5.2.4 Inhibice internalizace *in vitro***

Buněčná linie HepG2 ( $3 \times 10^5$  / ml) byla nasazena o 24 jamkové destičky (Corning®, Sigma-ALdrich, Praha, Česká republika) a inkubována čtyři dny ve standardních podmínkách (MEM médium, 37 °C, 4% CO<sub>2</sub>). Následně byla k vybraným jamkám přidána na půl hodiny 0.4M hypertonická sukrosa (n=3) nebo 4 mM methyl- $\beta$ -cyklodextrin (MBCD) (n=3). Po půl hodině byl do všech jamek přidán GG-PMeOx-1-FITC na čtyři hodiny (n=9) mimo kontrolní jamky (HepG2 pouze v inkubačním médiu). Po čtyřech hodinách, byly buňky trypsinizovány a sesbírány pro měření na průtokovém cytometru FC500 (Beckman Coulter, Irving, TX, USA). Před měřením na průtokovém cytometru byly buňky po dobu 10 minut barveny pomocí 20  $\mu$ l 7'AAD (Molecular Probes™, Life Technologies, Praha, Česká republika) k odlišení mrtvých a živých buněk.

### 5.2.5 Zvířecí modely a indukce nádorů

Veškeré experimenty se zvířaty byly schváleny etickou komisí a byly provedeny v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU. Všechna zvířata byla chována v cyklu 12 hodin světla a 12 hodin tmy a měla neustálý přístup k vodě i potravě.

Pro testování glykogenových i mananových konjugátů v nenádorovém modelu byly použity samice myšího kmene C57BL/6 (Anlab, Praha, Česká republika).

Testování glykogenových konjugátů v nádorovém modelu bylo provedeno se samci imunodeficientních potkanů kmene RNU (Velaz, Praha, Česká republika). Potkanům byly implantovány podkožní nádory. Nádory (HUH7 linie  $5 \times 10^6$  buněk v 200  $\mu$ l PBS na injekci) byly injikovány do pravé zadní končetiny ze hřbetní strany. V průběhu indukce nádoru byla zvířata anestezizována isofluranem (5% pro uvedení do anestézie a 1% pro udržování anestézie).

Mananové konjugáty byly testovány v samicích myšího kmene *Balb/c* (Velaz, Praha, Česká republika) s indukovanými syngenními orthotopickými nádory. Nádory byly indukovány injekcí 4T1 buněčné linie ( $0.30 \pm 0.05 \times 10^6$  buněk v 50  $\mu$ l PBS na injekci), injekce byly aplikovány do pravé abdominální prsní žlázy. V průběhu indukce nádoru byly myši anestezizovány isofluranem (5% pro uvedení do anestézie a 2% pro udržování anestézie).

### 5.2.6 MRI polymerních konjugátů a spektroskopie

Pro MRI polymerních konjugátů byl použit 4.7 T tomograf (Bruker, BioSpin, Ettlingen, Německo) a radiofrekvenční cívka s vnitřním průměrem 7 cm. Pro všechna měření byl jako kontrola použit klinicky používaný komerční kontrast pro MR gadoterate meglumine (GM, Dotarem).  $T_1$  vážené MR snímky polymerních konjugátů na bázi glykogenu byly získány pomocí RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes) sekvence (opakovací čas TR = 125 ms, čas echa 11.6 ms, prostorové rozlišení  $0.2 \times 0.2 \times 1.5$  mm<sup>3</sup>, čas skenování 6 minut 24 sekund). Jako reference sloužila zkumavka s vodou. Oblasti zájmu (region of interest, ROI) o stejné velikosti byly zakresleny okolo každého vzorku a byl spočítán poměr kontrastu k šumu (contrast to noise ratio, CNR) pro každý vzorek ku vzorku referenčnímu. Nasnímané MR snímky byly procesovány v programu ImageJ (verze 1.46r, National Institute of Health, USA).

### 5.2.7 Fluorescenční zobrazování *in vivo*

Pro veškeré *in vivo* a *ex vivo* fluorescenční měření (fluorescence imaging, FLI) byl použit přístroj IVIS<sup>®</sup> Lumina XR optical imager (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) a zvířata byla měřena v isofluoranové anestézii (5% pro navození anestézie, 1-2% v průběhu měření).

Pro snímání zvířat, kterým byl aplikováno *i.v.* 100  $\mu$ l roztoku GG-GdDOTA-Dy615 (14.3 mg GG-GdDOTA-Dy615 v 1.2 ml 0.15 mol/L NaCl), byl použit excitační filtr 605 nm a emisní filtr Cy5.5 (695-770 nm). Expoziční čas v tomto případě byl 5 minut. Pokusná zvířata byla měřena v několika časových bodech, a to ihned po aplikaci GG-GdDOTA-Dy615, dále po 2, 6 a 24 hodinách od aplikace. Po posledním měření byla zvířata usmrcena předávkováním anestetiky a byla změřena fluorescence vnitřních orgánů (jater, sleziny, ledvin) při použití stejného nastavení měřícího přístroje jako pro *in vivo* měření.

Tři týdny po indukci HUH7 nádorů byly snímány RNU potkani, a to před a po aplikaci GG, GOX a GM ve dvou různých koncentracích (0.02 nebo 0.04 mmol Gd<sup>3+</sup>/kg). Fluorescenční měření probíhalo ihned po snímání na MR, a to za použití 30s expozice, apertury 4 (f/stop) a excitačního filtru 745 nm, emisního pak 810-875 nm. Snímání bylo zaměřeno na oblast nádoru a jater. Týden po aplikaci glykogenových konjugátů byla část (n=2) zvířat usmrcena a orgánům byla změřena fluorescence před jejich přípravou k histologické analýze.

C57/6J B6 myši (n=3 na skupinu) byly monitorovány tři týdny po injekci MN nebo MNOX (o koncentraci 3.5 mg Gd<sup>3+</sup>/ml a 0.64 mg/ml IR800) do lýtkového svalu pravé zadní končetiny. Konkrétní časové body FL měření byly: před, ihned po aplikaci MN/MNOX a dále 2 a 6 hodin po aplikaci a pak 1, 2, 3, 4, 7, 14 a 21 dní po aplikaci mananových konjugátů. Expoziční čas byl 60 s a excitační a emisní filtr byl stejný jako u měření RNU potkanů po aplikaci GG, GOX a GM. Vždy jedno zvíře ze skupiny bylo po 7, 14 a 21 dnech usmrceno a byla změřena fluorescence vnitřních orgánů.

Parametry měření nádorových *Balb/c* myši po aplikaci MN a MNOX byly stejné jako u měření C56/6J B6 myši. Zvířata byla měřena před, ihned po a dále 2, 4, 6, 24, 48, 72 a 168 h po aplikaci mananových konjugátů. Mananové konjugáty byly aplikovány při průměru nádorů minimálně 2 mm a byly injikovány *i.m.* do zadní pravé končetiny o koncentraci Gd<sup>3+</sup> 18 mM na 1 ml (0.05361 mg IR800CW na 1 ml v případě MN a 0.04932 mg IR800CW na 1 ml v případě MNOX). Vybraná zvířata ze skupiny (n=2 na skupinu a

časový bod) byla 1, 3 a 7 dní po aplikaci mananových konjugátů usmrcena předávkováním anestetika a byla změřena fluorescence vnitřních orgánů (jater, ledvin, sleziny, lymfatických uzlin a nádoru) před jejich přípravou k histologické analýze.

Vyhodnocení signálu u všech měření pro všechny typy fluorescenčních experimentů *in a ex vivo* probíhalo pomocí zakreslení ROI, a to dle typu měření buď okolo celého zvířete, nebo jednotlivé oblasti či orgánu. Pro tyto ROI pak byla stanovena a hodnocena průměrná účinnost záření ( $[\text{photon/s/cm}^2]/[\mu\text{W/cm}^2]$ ). Všechny fluorescenční snímky byly automaticky proloženy snímky fotografickými.

### 5.2.8 MRI *in vivo*

U všech *in vivo* měření pomocí MR byla pokusná zvířata uspána inhalační anestézií. Jako inhalační anestézie byl používán isofluran, a to v 5% koncentraci pro navození anestézie a 1% pro udržování anestézie během měření. Během měření byl pokusným zvířatům vždy monitorován dech a tep. Pro veškerá *in vivo* měření byl použit 4.7T MR tomograf (Bruker BioSpin, Ettlingen, Německo) s ručně vyráběnými speciálními radiofrekvenčními cívkami přizpůsobenými konkrétním experimentům.

V případě měření RNU potkanů s indukovanými podkožními nádory bylo měření zahájeno tři týdny po indukci nádorů, která proběhla pomocí *s.c.* injekce HUH7 buněk. Byly pořízeny  $T_1$ -vážené MR snímky nádorů, jater a ledvin, a to před a po aplikaci GG, GOX a GM. Všechny tři látky byly podány ve dvou koncentracích (0.02 mmol  $\text{Gd}^{3+}/\text{kg}$  a 0.04 mmol  $\text{Gd}^{3+}/\text{kg}$ ). Snímky byly pořízené před podáním látek, ihned po podání a následně 10 minut po podání, 2 hodiny po podání a 1, 2, 3 a 7 dní od podání GG, GOX nebo GM. Parametry MRI použité v tomto konkrétním experimentu byly následující: spin-echo sekvence pro zobrazení nádorů byla  $\text{TR} = 125 \text{ ms}$ ,  $\text{TE} = 11.6 \text{ ms}$ , prostorové rozlišení bylo  $0.25 \times 0.25 \times 1.50 \text{ mm}^3$ , pořízeno bylo 8 akvizic, čas skenování 4 min 16 s; sekvence gradientového echa pro játra a ledviny pak byla:  $\text{TR} = 72 \text{ ms}$ ,  $\text{TE} = 4.6 \text{ ms}$ , prostorové rozlišení bylo  $0.25 \times 0.25 \times 1.50 \text{ mm}^3$ , pořízeno bylo 12 akvizic, čas skenování 3 min 41 s. Hodnoty CNR u nádorů, jater a ledvin byly vztahovány ke svalu a vypočteny v každém časovém bodě z ručně zadaných ROI. CNR mapy byly vypočteny na základě pixelového zpracování MR snímků v námi definovaném Matlab skriptu (Matlab, MathWorks, Natick, MA, USA).

Monitorování zdravých C57/6J B6 myši ( $n=3$  pro každou skupinu) probíhalo po dobu tří týdnů. Pokusným myším bylo do lýtkového svalu pravé zadní končetiny aplikováno 100  $\mu\text{l}$  MN či MNOX (v obou případech o koncentraci 3.5 mg  $\text{Gd}^{3+}/\text{ml}$  a 0.64

mg/ml IR800CW). MRI bylo provedeno ihned po *i.m.* podání konjugátů a následně po 6 h a 1, 2, 3, 4, 7, 14 a 21 dnech od podání. T<sub>1</sub>-vážené axiální a koronální MR snímky lýtkového svalu a lymfatických uzlin byly pořízeny pomocí turbo spin echo sekvence s následujícími parametry: TR = 339 ms, TE = 12 ms, TF = 2, prostorové rozlišení bylo 0.16 × 0.16 × 0.70 mm<sup>3</sup>, pořízeno bylo 9 akvizic, čas skenování 8 min 40 s. Hodnoty CNR inguinální (tříselné) lymfatické uzliny byly spočítány z MR snímků, a to v procentech rozdílu intenzit signálu z lymfatických uzlin ve vztahu k okolnímu tuku (normalizováno na signál tuku).

V posledním experimentu s *Balb/c* myši (Velaz, Praha, Česká republika) s orthotopickými 4T1 nádory byly pořízeny T<sub>1</sub>-vážené axiální a koronální MR snímky svalu zadní končetiny a lymfatické uzliny pomocí standartní 2D rychlé akvizice a RARE multispin echo sekvence s následujícími parametry: TR = 339 ms, TE = 12 ms, TF = 2, prostorové rozlišení bylo 0.16 × 0.16 × 0.70 mm<sup>3</sup>, čas skenování 8 min 40 s. Data byla analyzována a hodnocena jako procenta poměru signálu k šumu (signal to noise ratio, SNR), kde signál představovala míra kontrastu z nádoru či svalu zadní končetiny. Hodnoty SNR před aplikací mananových konjugátů byly brány jako 100 %.

### 5.2.9 Histologie

Vzorky (n=2 pro každou skupinu zvířat s nádory) nádorů, jater, ledvin a sleziny (pro zvířata s aplikovanými GG konjugáty) nebo SLN (pro zvířata s aplikovanými MN konjugáty) byly odebrány sedm dní po aplikaci GG nebo MN konjugátů. Všechny vzorky byly makroskopicky prozkoumány a následně fixovány přes noc ve 4% roztoku formaldehydu ve 4°C. Následně byly vzorky zamontovány do parafinových bločků a z nich připraveny 4μm řezy. Řezy byly standardně barveny hematoxylinem a eosinem (HE) a posléze byla mikroskopicky analyzována případná přítomnost patologických změn.

### 5.2.10 Statistická analýza

Software GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) byl použit pro statistickou analýzu MTT testu a *in vivo* výsledků s glykogenovými konjugáty, dále pak pro hodnocení výsledků testování mananových konjugátů pomocí MRI *in vivo* a fluorescence *in vivo*.

V případě MTT testu s glykogenovými konjugáty byl jako test zvolena jednocestná ANOVA (analýza variance). *In vivo* výsledky s glykogenovými konjugáty

byly hodnoceny dvouvýběrovým t-testem pokud šlo o hodnocení rozdílů mezi dvěma skupinami. Pro analýzu rozdílů mezi třemi a více skupinami byla použita jednocestná ANOVA. Dvouvýběrový t-test byl zvolen i pro hodnocení výsledků testování mananových konjugátů pomocí MRI *in vivo* a fluorescence *in vivo*. Veškeré testování mělo míru signifikance nastavenou jako  $p < 0.05$ .

Analýza dat z MTT testu s mananovými konjugáty byla provedena v programu R 3.6.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) pomocí lineárně smíšených modelů (lme4 package). Úroveň signifikance byla opět nastavena jako  $p < 0.05$ .

## 6 Výsledky

### 6.1 Biologická charakterizace nového hybridního kopolymeru na bázi glykogenu

**Jiráková M**, Pospíšilová A, Rabyk M, Pařízek M, Kovář J, Gálisová A, Hrubý M, Jirák D. Drug Deliv Transl Res. 2018 Feb;8(1):73-82.

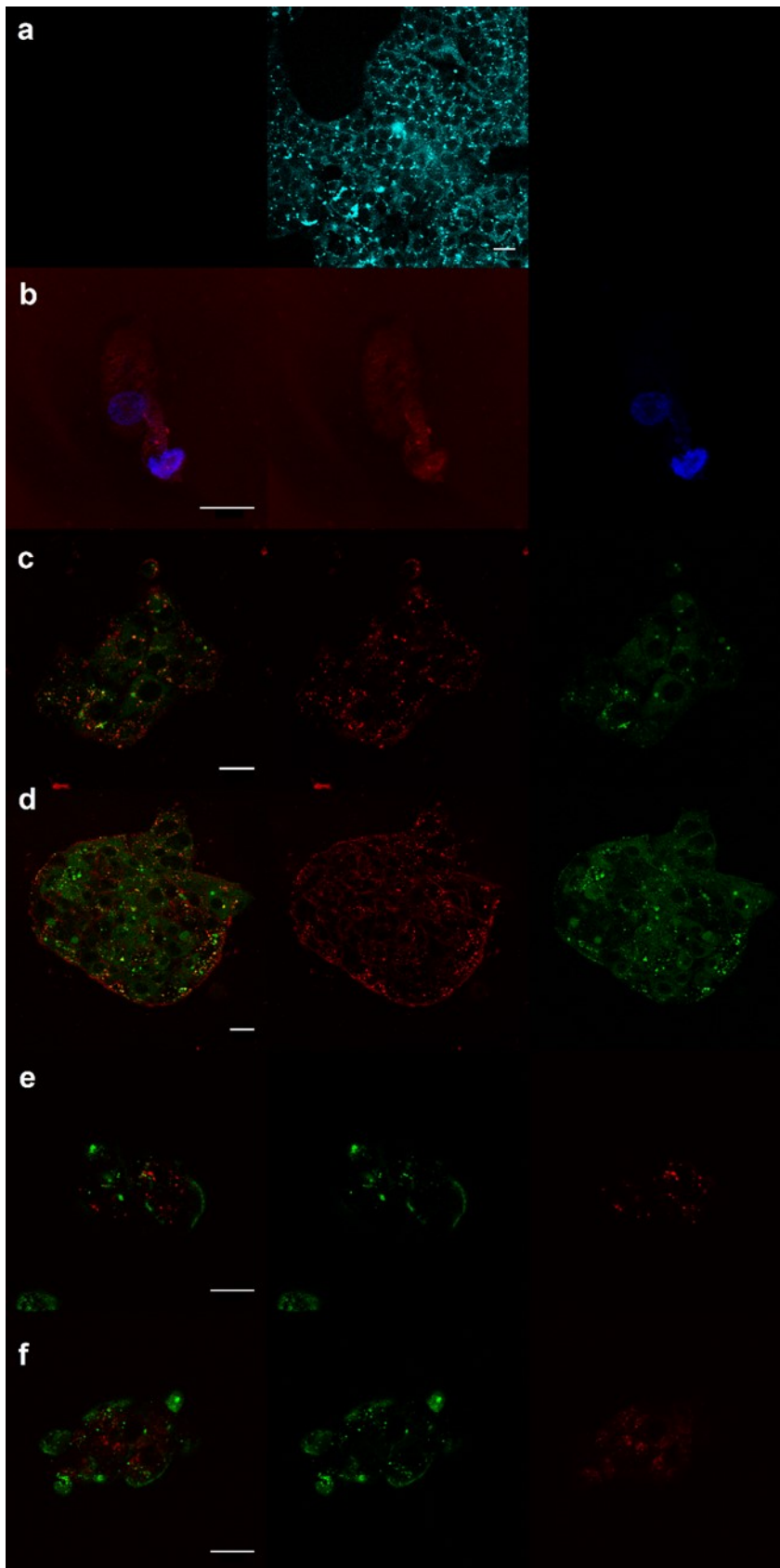
**Podíl na publikaci:** design biologických experimentů, experimentální část (kultivace buněk, konfokální mikroskopie, fluorescenční měření *in vitro*, MTT assay, inhibice internalizace, příprava a provedení *in vivo* experimentů), statistická analýza výsledků, příprava manuskriptu

Oba glykogen-*graft*-poly(2-methyl-2-oxazoliny) (GG-PMeOx-1-Ds a GG-PMeOx-3-Ds) byly připraveny analogicky k dříve popsané přípravě termoresponsivních glycogen-*graft*-poly(2-isopropyl-2-oxazoline-co-2-butyl-2-oxazolinů) (Duncan et al., 2008). Cysteinamine byl přidán obdobně jako v dříve publikované proceduře pro alylovaný glykogen (Filippov et al., 2012). Glykogenové konjugáty obsahující amino skupinu byly následně označeny fluorescenčními barvami, což vedlo ke vzniku glykogenových konjugátů s vysokým obsahem fluorescenčních sond, dostatečným pro *in vitro* i *in vivo* zobrazování. Místo cytoplazmatické lokalizace a cytotoxické parametry těchto hybridních kopolymerů obsahujících POX byly porovnány s biologickými vlastnostmi konjugátů bez POX (GG-GdDOTA-Dy615) za účelem určení vlivu POX konjugace na tyto vlastnosti.

Výsledky z konfokální fluorescenční mikroskopie pro GG-PMeOx-1-Ds ukázaly, že tento glykogenový konjugát, respektive fluorescenční barva dansyl (Ds) se nenachází v jádrech HepG2 buněk a je volně distribuována v cytoplazmě, s tendencí tvořit klastry (Obrázek 5a). Obdobné výsledky jako pro GG-PMeOx-1-Ds jsme pozorovali i pro GG-GdDOTA-Dy615. Tento glykogenový konjugát, respektive fluorescenční značka Dyomics 615 (Dy615), nebyl přítomný v jádrech HepG2 buněk a byl volně distribuován v cytoplazmě, místy vykazaval vyšší akumulaci v klastrech (Obrázek 5b). Absence GG-GdDOTA-Dy615 v jádru buněk byla potvrzena i po proložení signálu z Dy615 a Hoechst 33342, tedy jadernou barvou. Pearsonův koeficient po proložení obou signálů byl pod hodnotou 0.2 .

Dále byla provedena kolokalizační studie pro určení způsobu metabolismu externě podaného glykogenu s cílem zjistit, zda je degradován v lysozómech nebo pomocí enzymů standardně metabolizujících intracelulární glykogen. Všechny hodnoty Pearsonova koeficientu získané výpočtem z proložených signálů z fluoroforů příslušných glykogenových konjugátů a LysoTrackeru® byly nízké (GG-PMeOx-1-FITC: 0.1-0.18; GG-GdDOTA-Dy615 bez přidané D-glukózy v médiu: 0.3-0.45; a GG-GdDOTA-Dy615 s přidanou D-glukózou do media: 0.42-0.46), ukazující na velmi slabou kolokalizaci u GG-PMeO-1-FITC a omezenou kolokalizaci pro GG-GdDOTA-Dy615 (Obrázek 5d-f). Přidání D-glukózy do inkubačního media HepG2 buněk mělo na kolokalizaci glykogenových konjugátů s lysozómy pouze zanedbatelný vliv.

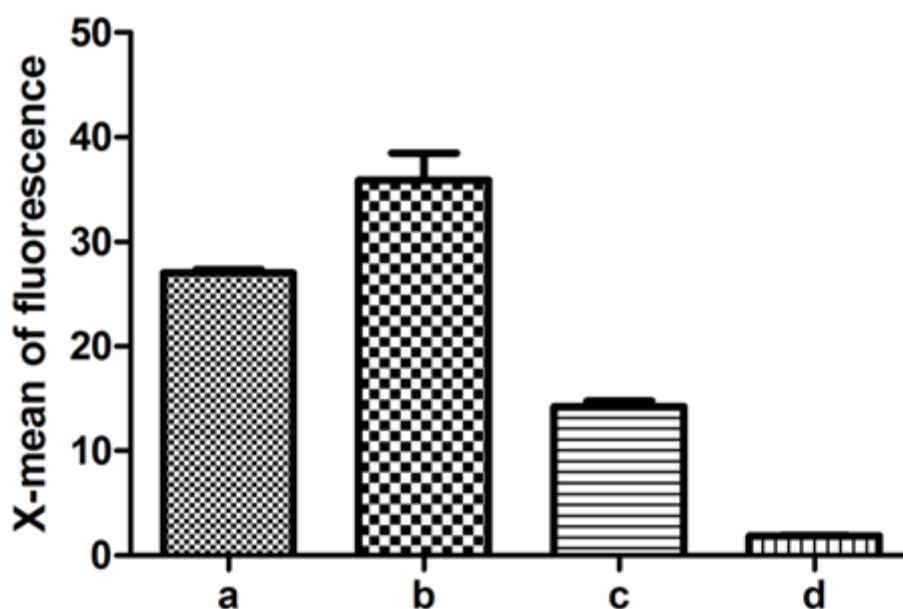




**Obrázek 5** Snímky z konfokálního mikroskopu Leica SP2. Na obrázku jsou HepG2 buňky, které byly inkubovány s třemi různými typy modifikovaného glykogenu (pro všechny typy modifikovaného glykogenu byla použita finální 0,3% koncentrace v inkubačním médiu). Levý sloupec snímků představuje prolezení jednotlivých fluorescenčních signálů z prostředního a

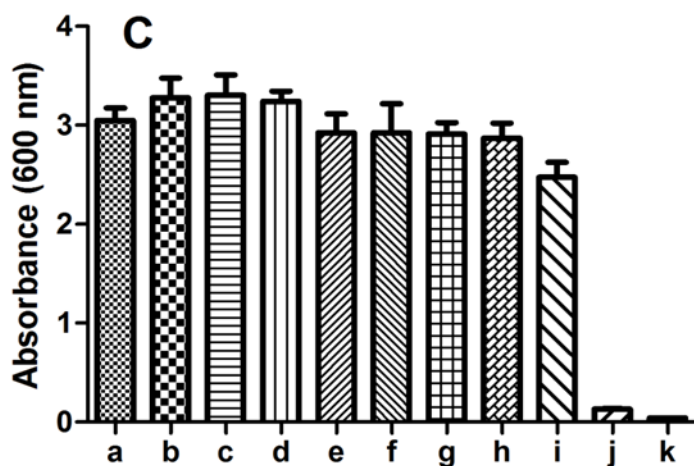
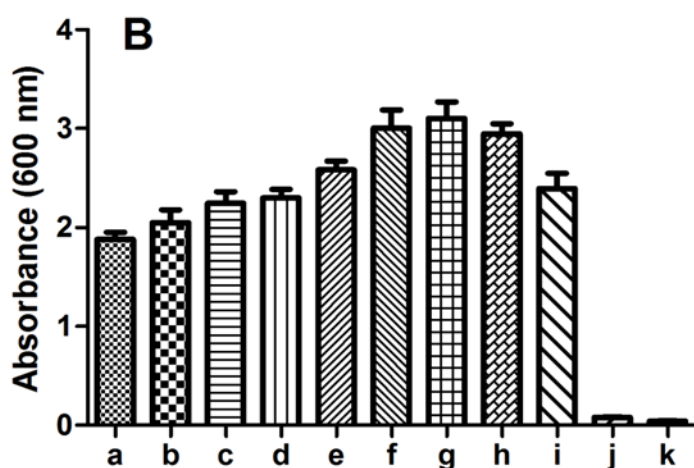
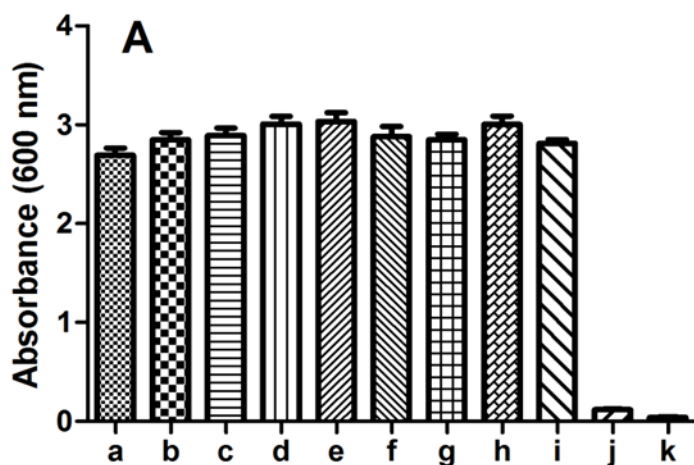
pravého sloupce. Prostřední sloupec zobrazuje fluorescenční signál jednotlivých modifikovaných typů glykogenu v HepG2 buňkách. Pravý sloupec představuje fluorescenční signál pro konkrétní fluorescenční sondy, dle typu snímků buďto Hoechst 33342 nebo LysoTracker® Green nebo LysoTracker® Deep Red. Řádky: (a) GG-PMeOx-1-Ds samotný s HepG2 buňkami, (b) GG-GdDOTA-Dy615 s Hoechst 33342, (c) GG-GdDOTA-Dy615 s LysoTracker® Green, (d) GG-GdDOTA-Dy615 s LysoTracker® Green a přidavkem glukózy do média (finální koncentrace 22 mM), (e) GG-PMeOx-1-FITC s LysoTracker® Deep Red, (f) GG-PMeOx-1-FITC s LysoTracker® Deep Red a přidavkem glukózy do média (finální koncentrace 22 mM).

Studie typu endocytózy probíhaly na průtokovém cytometru za použití dvou typů inhibitorů endocytózy, které byly přidány do inkubačního média před a při inkubaci buněk s glykogenovými konjugáty. Jakožto inhibitor clathrinem zprostředkované endocytózy byla použita hypertonická sukrosa, pro inhibici kaveolinem zprostředkované endocytózy byl zvolen methyl- $\beta$ -cyklodextrin (MBCD). Výsledky ukazují, že X-mean (X-průměr) fluorescence byl nižší, a tedy i množství endocytovaného glykogenového konjugátu bylo nižší, pokud byly buňky preinkubovány s MBCD a následně inkubovány s MBCD i po dobu inkubace s GG-PMeOx-1-FITC. Tyto výsledky ukazují na přednostní použití kaveolinem zprostředkované endocytózy pro externě podaný glykogen (Obrázek 6).



**Obrázek 6** Výsledky z průtokové cytometrie, stanovení typu endocytózy pomocí dvou inhibitorů pro jednotlivé typy endocytózy. HepG2 buňky byly po dobu 4 hodin inkubovány s GG-PMeOx-1-FITC. Sloupce znázorňují HepG2 buňky inkubované s (a) samotným GG-PMeOx-1-FITC, (b) GG-PMeOx-1-FITC a hyperonickou sacharózou, (c) GG-PMeOx-1-FITC a MBCD, (d) čistým inkubačním médiem.

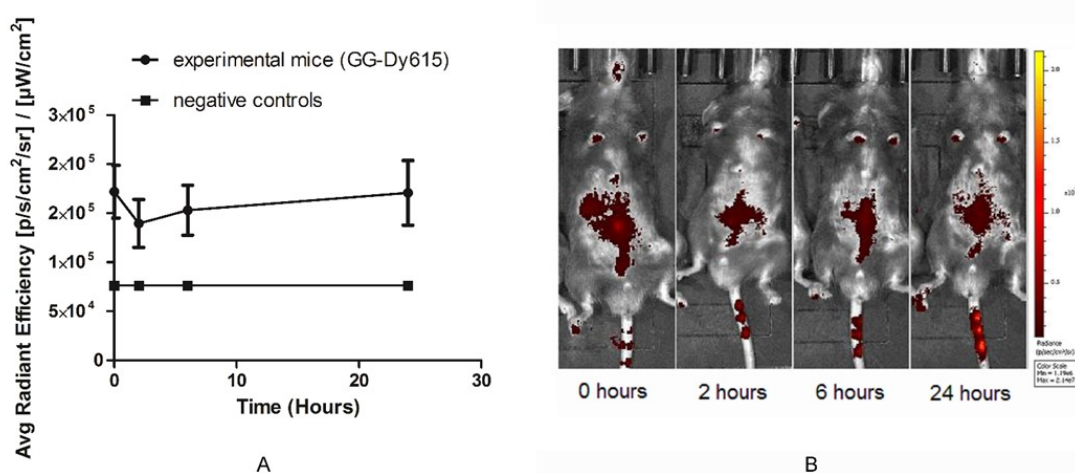
Pro stanovení míry cytotoxicity glykogenových konjugátů byl zvolen MTT test. Tento test hodnotil, zda jsou glykogenové konjugáty ve všech použitých koncentracích netoxické. Hodnoty viability pro buňky inkubované s GG-PMeOx-1-FITC byly srovnatelné s hodnotami viability pro kontrolní buňky (Obrázek 7A) a potvrdilo se, že GG-PMeOx-1-FITC je netoxický. Stejně závěry lze vyvodit i pro GG-GdDOTA-Dy615 (Obrázek 7B). Přestože viabilita mírně rostla s nižšími koncentracemi GG-GdDOTA-Dy615, rozdíly ve viabilitě kontrolních buněk a buněk inkubovaných s GG-GdDOTA-Dy615 nebyly ani pro nejvyšší koncentrace GG-GdDOTA-Dy615 signifikantní. Životnost buněk nebyla snížena ani po inkubaci s nativním nemodifikovaným glykogenem, který byl použit jako základ pro syntézu glykogenových konjugátů (Obrázek 7C).



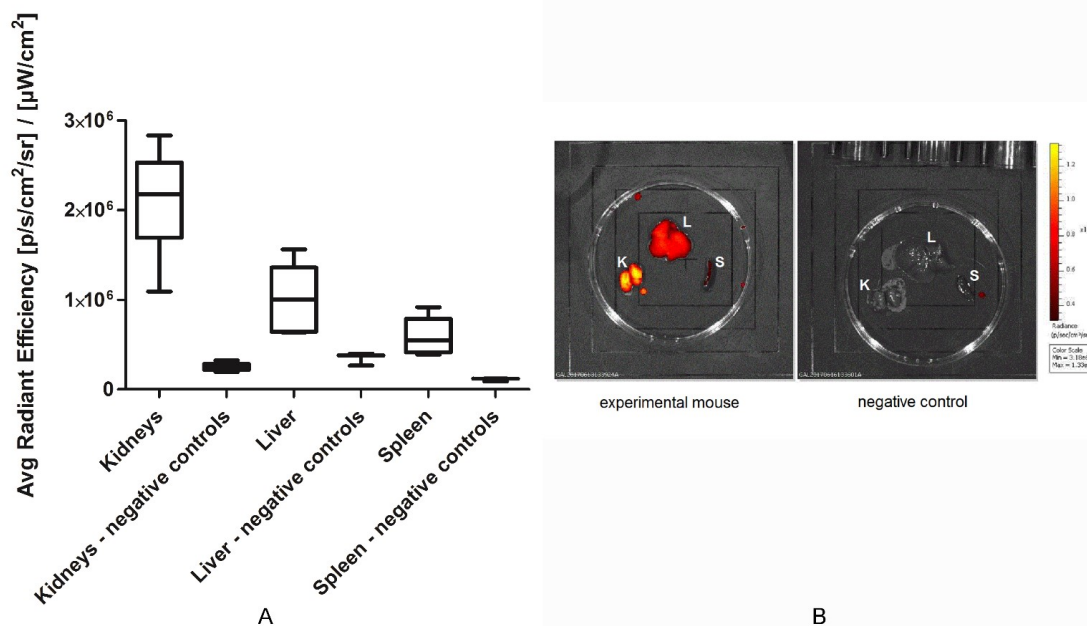
**Obrázek 7** Výsledky z MTT testu cytotoxicity pro (A) GG-PMeOx-1-FITC, (B) GG-GdDOTA-Dy615 a (C) čistý glykogen bez modifikací. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Sloupce představují hodnoty absorbance pro HepG2 buňky inkubované s různými koncentracemi GG-PMeOx-1-FITC nebo GG-GdDOTA-Dy615 či glykogenu bez modifikací, a to konkrétně s

koncentracemi: (a) 0.6%, (b) 0.12%, (c) 0.024%, (d) 0.0048%, (e) 0.00096%, (f) 0.000192%, (g) 0.0000384%. Sloupce (h) a (i) představují HepG2 buňky pěstované pouze v inkubační médium (pozitivní kontroly). Sloupec (j) znázorňuje hodnoty absorbance pro médium s přidávkem MTT, ale bez HepG2 buněčné linie (negativní kontrola). Sloupec (k) znázorňuje hodnoty absorbance pro médium samotné bez MTT i bez HepG2 buněčné linie. Pro zhodnocení všech MTT testů byla použita jednocestná ANOVA. Rozdíly mezi sloupci (j) či (k) a ostatními sloupci byly vždy na  $p$ -hodnotě  $\leq 0.001$  (není vyznačeno v grafech).

Po *in vitro* testech byl GG-GdDOTA-Dy615, který má navázanou fluorescenční značku vhodnou pro *in vivo* zobrazování, otestován ve zvířecím nenádorovém modelu. GG-GDDOTA-Dy615 byl *i.v.* injikován a byla hodnocena biodistribuce, biodegradace a eliminace konjugátu pomocí optického (FL) zobrazování. Průměrná účinnost záření vykazovala počáteční pokles po aplikaci (ROI, ze které hodnota byla stanovována zahrnovala celou plochu zvířete) (Obrázek 8A). Po 24 hodinách od aplikace konjugátu byl signál stále detekovatelný a postupně mírně rostl. Po usmrcení zvířat byl nasnímán fluorescenční signál z vnitřních orgánů (Obrázek 9). Játra a ledviny vykazovaly fluorescenční signál, naopak ze sleziny byl fluorescenční signál pouze zanedbatelný. Signál z experimentálních myší, kterým byl podán GG-GdDOTA-Dy615, byl řádově vyšší než z myší kontrolních, kterým GG-GdDOTA-Dy615 aplikován nebyl (Obrázek 9B). Výsledky tedy ukazují, že se jedná prokazatelně o signál glykogenového konjugátu a nikoli pouze o signál z autofluorescence.



**Obrázek 8** Vyhodnocení fluorescenčního *in vivo* signálu. (A) Fluorescenční signál z C57BL/6 myši ( $n=6$ ) po *i.v.* aplikaci GG-GdDOTA-Dy615 ve srovnání s negativními kontrolami (myši bez aplikace GG-GdDOTA-Dy615,  $n=3$ ). (B) Repräsentativní obrázky změny fluorescenčního signálu v čase po *i.v.* aplikaci GG-GdDOTA-Dy615 u C57BL/6 myši. Rozsah hodnot fluorescence (vpravo od snímků) je v uvedených hodnotách radiance (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) je pro všechny snímky stejný – minimum je  $1.96 \times 10^6$  a maximum je  $2.14 \times 10^7$ . Experimentl mice (GG-Dy615)=myš s aplikovaným GG-GdDOTA-Dy615; negative controls=myš bez aplikovaného GG-GdDOTA-Dy615; Time (Hours)=Čas (hodiny)



**Obrázek 9** Vyhodnocení fluorescenčního ex vivo signálu. (A) Průměrná hodnota záření z orgánů (ledvin, jater a sleziny) z C57BL/6 myši (n=6) 24 hodin po i.v. aplikaci GG-GdDOTA-Dy615 ve srovnání s negativními kontrolami (C57BL/6 myši bez aplikace GG-GdDOTA-Dy615, n=3). (B) Reprezentativní snímky fluorescenčního signálu orgánů (K=ledviny, L=játra, S=slezina) z C57BL/6 myši 24 hodin po i.v. aplikaci GG-GdDOTA-Dy615 ve srovnání s negativní kontrolou - C57BL/6 myši bez aplikace GG-GdDOTA-Dy615. Rozsah hodnot fluorescence (vpravo od snímků) je v uvedených hodnotách radiance (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) je pro oba snímky stejný – minimum je  $3.16 \times 10^6$  a maximum je  $1.33 \times 10^7$ . Experimentální myš (GG-GdDOTA-Dy615)=myš s aplikovaným GG-GdDOTA-615; negative controls=myš bez aplikovaného GG-GdDOTA-Dy615; kidneys=ledviny; liver=játra; spleen=slezina.

Souhrně lze tedy konstatovat, že hybridní kopolymery na bázi glykogenu se do buněk dostávají především kaveolinem zprostředkovanou endocytózou a následně jsou volně distribuovány v cytoplasmě, do lyzozómů se dostávají pouze v omezené míře. Celkový in vivo FL signál kopolymeru na bázi glykogenu po počátečním poklesu mírně roste, a to i po 24 hodinách od aplikace, ex vivo měření fluorescence neprokázalo akumulaci kopolymeru ve slezině.

**Poznámka autora:** Veškeré obrázky v kapitole 6.1 pochází z článku Jirátová M, Pospíšilová A, Rabyk M, Pařízek M, Kovář J, Gálisová A, Hrubý M, Jirák D. Biological characterization of a novel hybrid copolymer carrier system based on glycogen. Drug Deliv Transl Res. 2018 Feb;8(1):73-82. doi: 10.1007/s13346-017-0436-x. PMID: 29134553.

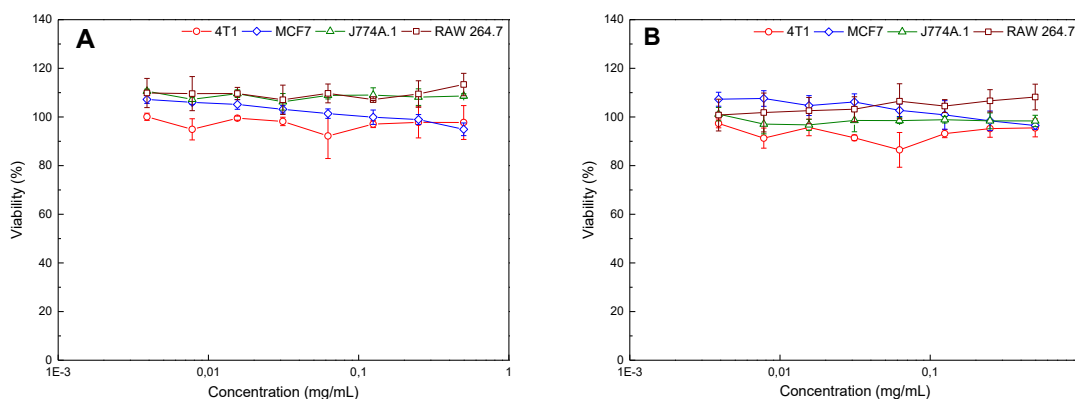


## 6.2 Konjugáty na bázi mananu jakožto platforma pro multimodální zobrazování lymfatických uzlin

Rabyk M, Galisova A, **Jiratova M**, Patsula V, Srbova L, Loukotova L, Parnica J, Jirak D, Stepanek P, Hruby M. J Mater Chem B. 2018 May 7;6(17):2584-2596.

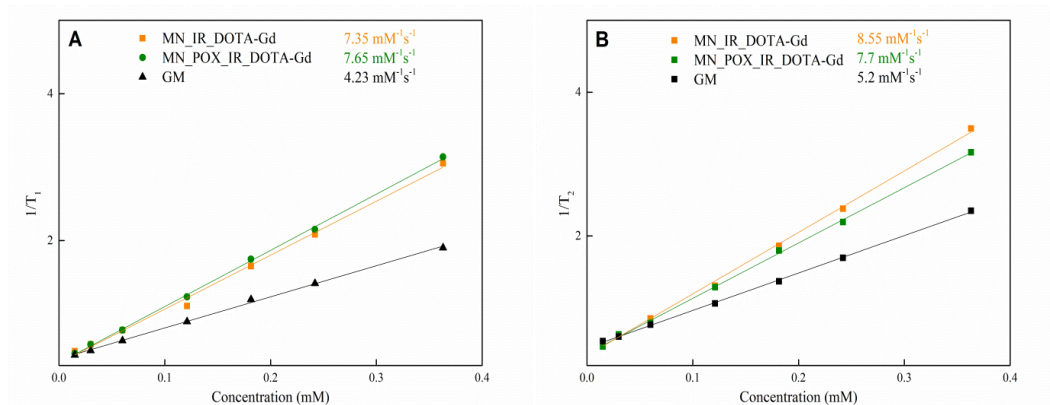
**Podíl na publikaci:** provedení experimentální *in vivo* části (MRI a fluorescenční zobrazování), příprava biologické části manuskriptu

Po chemických analýzách mananových konjugátů, které nejsou součástí této disertační práce, byla hodnocena i jejich biokompatibilita. Bylo provedeno hodnocení viability čtyř různých buněčných linií po inkubaci s mananovými konjugáty. Hodnoty viability buněk se po inkubaci s mananovými konjugáty pohybovaly mezi 85 až 110 % (Obrázek 10), přičemž viabilita kontrolních buněk bez inkubace s mananovými konjugáty byla určena jako 100 %. Nebyly pozorovány žádné změny viability v závislosti na použité koncentraci MN a MNOX.



**Obrázek 10** Procenta viabilních makrofágů (RAW 264.7 J774A.1), buněk myšního mamárního karcinomu (4T1) a buněk lidského karcinomu prsu (MCF7) po inkubaci s různými koncentracemi (A) MNOX a (B) MN. Koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0.004 – 0.5 mg/ml a inkubace trvala 72 h při standartních podmínkách (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Jako 100 % viability byla viabilita buněk bez inkubace s mananovými konjugáty. Viability (%)=životnost buněk v %; Concentration (mg/mL)=koncentrace MN/MNOX v mg/ml.

Pro potvrzení vhodných vlastností mananových konjugátů pro zobrazování pomocí MR byly nejdříve *in vitro* změřeny fantomy s konjugáty. Jak MN, tak i MNOX vykazovaly vyšší  $r_1$  a  $r_2$  relaxivity než komerčně dostupný GM při stejných koncentracích Gd<sup>3+</sup> (Obrázek 11A, B). MN a MNOX se od sebe v těchto parametrech nelišily a měly srovnatelné hodnoty  $r_1$  a  $r_2$  relaxivity.

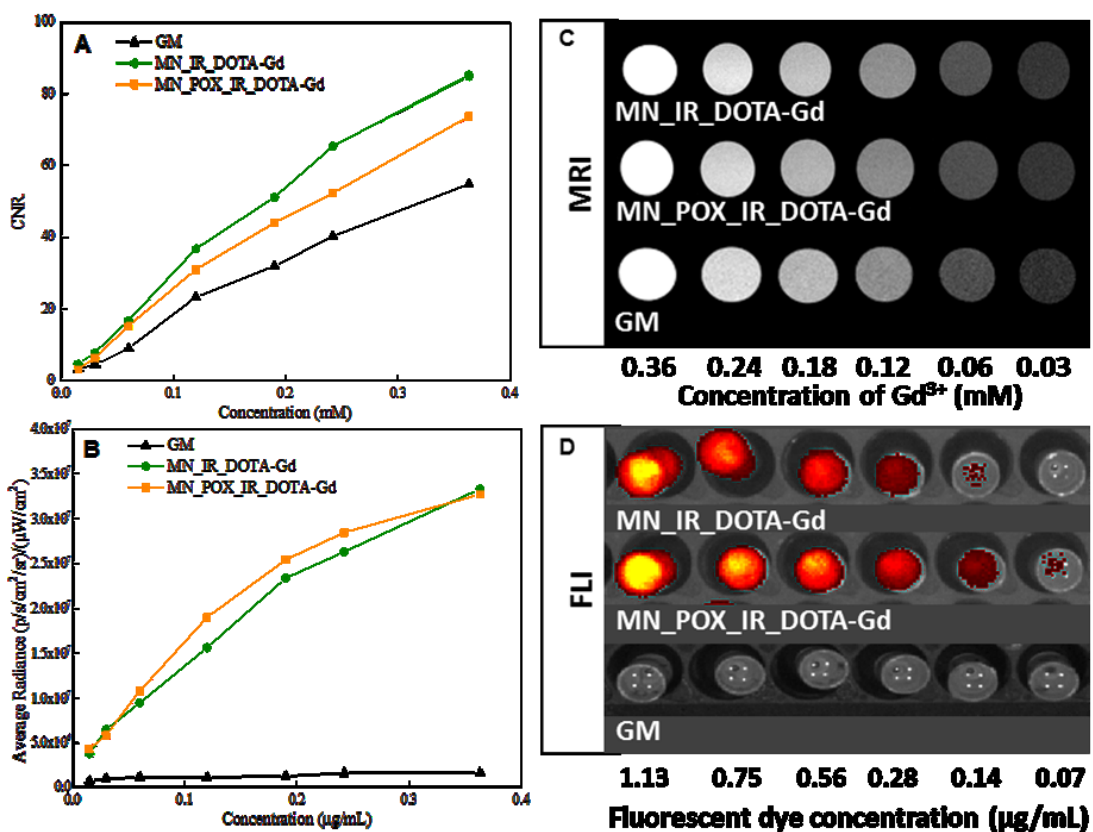


**Obrázek 11** Charakterizace mananových konjugátů pomocí  $^1\text{H}$  (A)  $r_1$  a (B)  $r_2$  relaxivit, měřených při  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a  $0.5\text{ T}$ . *MN\_IR\_DOTA-Gd* je synonymum pro *MN*, *MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd* je synonymem pro *MNOX*. Concentration (mM)=koncentrace (mM).

Fantomy mananových konjugátů se hodnotily i pomocí parametru CNR. Obdobně jako u  $r_1$  a  $r_2$  relaxivit měly oba mananové polymery vyšší CNR než kontrolní GM při stejné koncentraci  $\text{Gd}^{3+}$ . Nejvyšších hodnot CNR dosahoval MN, MNOX měl CNR hodnoty při stejné  $\text{Gd}^{3+}$  koncentraci nižší (Obrázek 12A). Pro všechny tři testované kontrastní próby (MN, MNOX, GM) byly pořízeny i reprezentativní MR snímky (Obrázek 12C).

Mananové konjugáty také vykazovaly silný FL signál, pokud byly měřeny jako *in vitro* fantomy naředěné na různé, postupně se snižující, koncentrace IR800CW. Hodnoty FL signálu *in vitro*, kde nemá velkou roli modifikace pomocí POX, byly pro oba mananové konjugáty srovnatelné. GM, který na sobě nemá navázanou fluorescenční molekulu, měl, dle očekávání, hodnoty FL signálu na úrovni pozadí či šumu (Obrázek 12B, D).

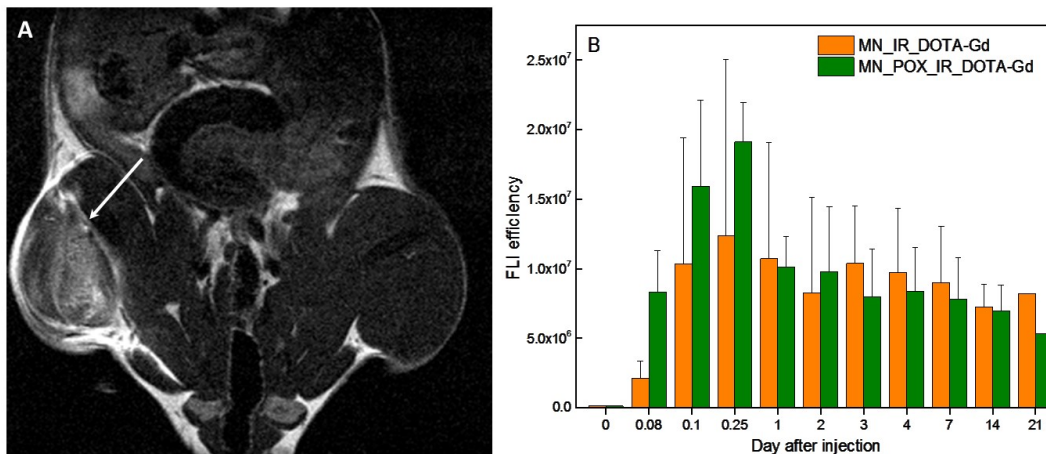




**Obrázek 12** Signály MNOX (MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd), MN (MN\_IR\_DOTA-Gd) a GM z magnetické rezonance (MR) a fluorescencního měření (FLI). (A) Hodnoty poměru signálu k šumu (CNR) byly vypočítány z MR snímků pro různé koncentrace kontrastních práb. (B) Fluorescenční signál pro různé koncentrace kontrastních práb byl vyneseno jako průměrné záření. (C) Repräsentativní MR snímky jednotlivých kontrastních práb o různých koncentracích Gd<sup>3+</sup>. (D) Repräsentativní snímky z fluorescencního zobrazování kontrastních práb, čísla pod snímkem představují koncentraci fluorescenční barvy (IR800CW – přítomen pouze v MN a MNOX) v µg/ml. Concentration of Gd<sup>3+</sup> (mM)=koncentrace Gd<sup>3+</sup> v mM; Average Radiance=průměrná radiance; Fluorescent dye concentration (µg/ml)=koncentrace fluorescencní značky v µg/ml.

Po základních testech *in vitro* jsme provedli experiment na zdravých imunokompetentních myších. Experimentálním zvířatům byl intramuskulárně aplikován buď MN (100 µl o koncentraci 3.5 mg Gd<sup>3+</sup> na 1 ml neboli 0.64 mg IR800CW na 1 ml) nebo MNOX (100 µl o koncentraci 3.5 mg Gd<sup>3+</sup> na 1 ml neboli 0.64 mg IR800CW na 1 ml). Následně byla zvířata po dobu 21 dní sledována na MRI a FLI. Zobrazovací metody byly použity ke sledování eliminace a distribuce mananových konjugátů v organismu a také k určení času, kdy je dosažena nejvyšší koncentrace v místě aplikace.

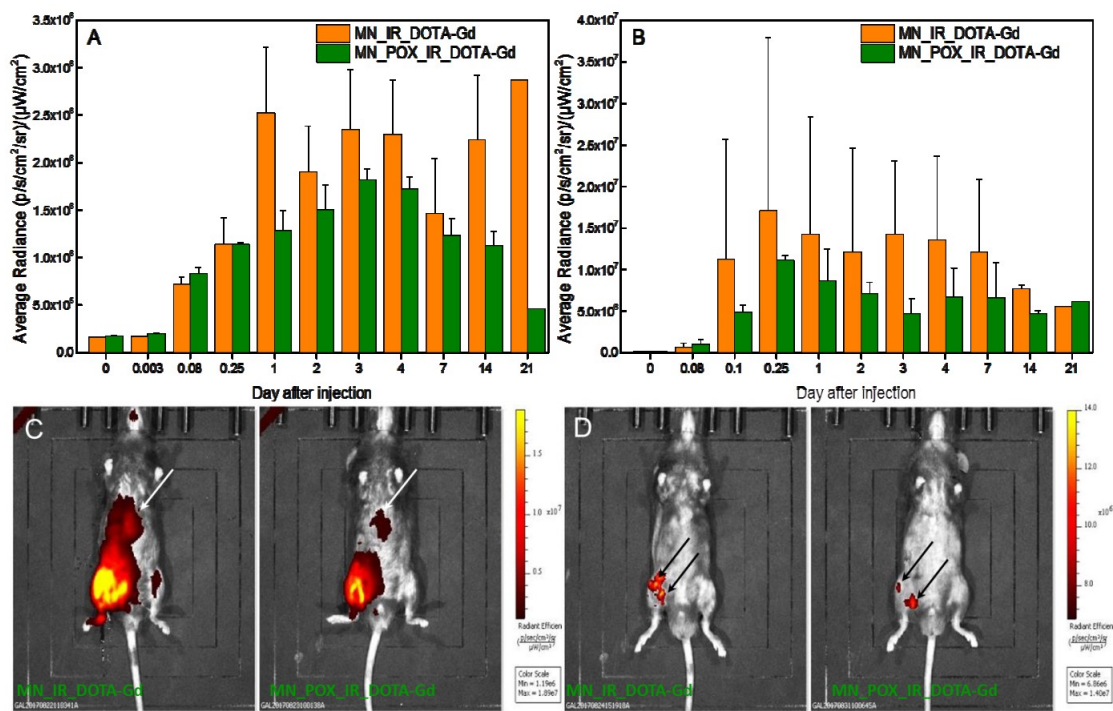
FL signál *in vivo* z místa aplikace nejprve během prvních 24 hodin od aplikace stoupal, následně začal klesat a klesal až do konce experimentu. FL signál MNOX konjugátu z místa vpichu pak u většiny měření během prvních 48 hodin od aplikace převyšoval FL signál MN konjugátu (Obrázek 13B).



**Obrázek 13** (A) Reprezentativní T1 vážený snímek z magnetické rezonance myši, které byl do svalu pravé dolní končetiny injikován MN, šipka označuje místo vpichu. (B) Časový průběh fluorescenčního in vivo signálu z místa vpichu pro skupinu injikovanou MN (MN\_IR\_DOTA-Gd) a MNOX (MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd). FLI efficiency=fluorescenční eficeince; Day after injection=dny po injekční aplikaci.

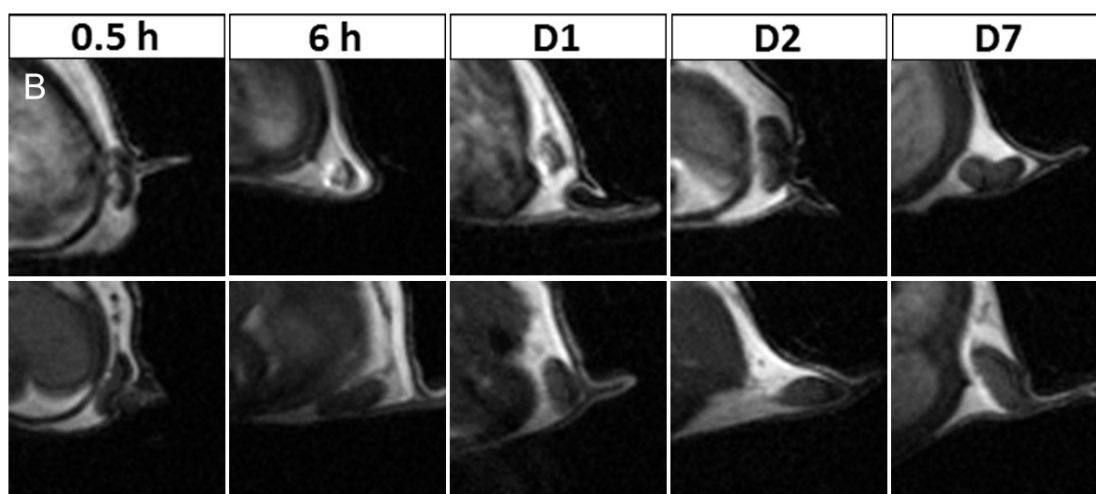
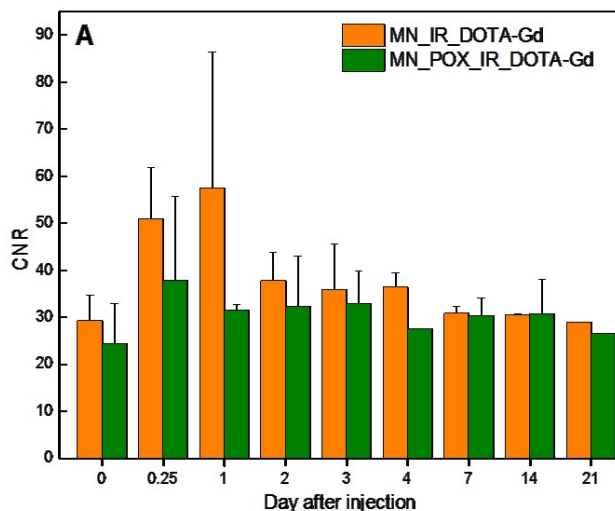
FL signál nebyl analyzován pouze z oblasti aplikace mananových konjugátů, ale zaměřili jsme se i na analýzu míry signálu v oblasti jater. Během prvních 24 hodin jsme pozorovali stejný či vyšší FL signál z oblasti jater u MNOX skupiny ve srovnání s MN skupinou. Nicméně po 24 hodinách od aplikace se trend změnil, MN skupina vykazovala vyšší FL signál z oblasti jater. Tento trend zůstal stejný až do ukončení experimentu (Obrázek 14A, C).

Další oblastí, ze které byl hodnocen FL signál, byla oblast inguinálních lymfatických uzlin. FL signál z inguinálních uzlin byl vyšší u MN skupiny, a to již během prvního dne a zůstal vyšší až do čtrnáctého dne po aplikaci MN či MNOX (Obrázek 14B, D).



**Obrázek 14** Časový průběh hodnot fluorescenčního signálu po aplikaci mananových konjugátů pocházející z (A) jater a (B) lymfatických uzlin. Reprezentativní fluorescenční snímky myši po injekci MN (MN\_IR\_DOTA-Gd) a MNOX (MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd), šipky označují (C) játra a (D) lymfatické uzliny. Average Radiance=průměrná radiance; Day after injection=dny po injekční aplikaci.

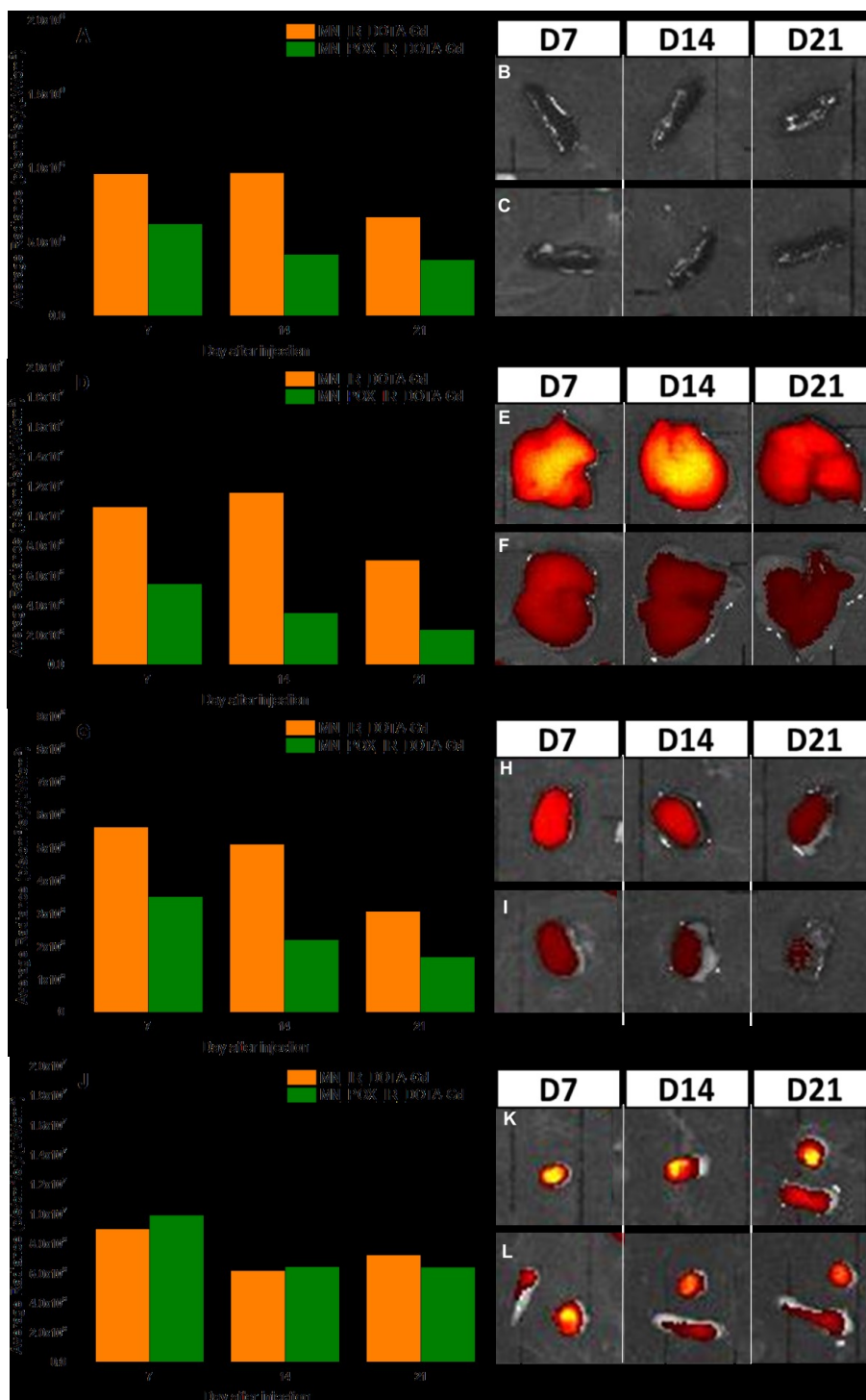
Zobrazování pomocí MRI potvrdilo přítomnost mananových konjugátů v lymfatických uzlinách (Obrázek 15B). Již během prvního dne od aplikace konjugátů byl MR signál, a z něj vypočítané CNR, vyšší v případě MN skupiny, což je ve shodě s výsledky získanými pomocí FLI (Obrázek 15A). MR signál byl také stabilně přítomen během celého experimentu a byl zcela jednoznačně odlišitelný od signálu ze svalu či uzliny na straně opačné k místu vpichu (Obrázek 13A, Obrázek 15B).



**Obrázek 15** (A) Časový průběh MR signálu z lymfatických uzlin měřeného po aplikaci MN (MN\_IR\_DOTA-Gd) a MNOX (MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd). (B) Reprezentativní  $T_1$  vážené MR snímky zobrazují lymfatickou uzlinu v různých časech od aplikace MN (MN\_IR\_DOTA-Gd) – horní řada; a MNOX (MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd) – spodní řada snímků. Day after injection=dny po injekční aplikaci.

Ve dnech 7, 14 a 21 od aplikace mananových konjugátů byla hodnocena i fluorescence vnitřních orgánů. Orgány (játra, slezina a ledviny) u MNOX skupiny měly nižší FL signál ve všech měřených časových bodech (Obrázek 16A-I). Lymfatické uzliny pak měly ve všech časových bodech u obou skupin (MN a MNOX) FL signál srovnatelný (Obrázek 16J, K, L). FL signál z lymfatických uzlin byl obdobný v den 7, 14 i 21. Naproti tomu FL signál z jater, slezin a ledvin vykazoval klesající tendenci v průběhu času.

Testování konjugátů na bázi mananu tedy ukázalo jejich netoxičnost a lepší vlastnosti pro zobrazování srovnání s GM. In vivo měření, jak MRI, tak FLI, prokázalo stabilní signál z inguinální lymfatické uzliny, který nevykazoval klesající tendenci, na rozdíl od signálu z vnitřních orgánů, ani u měření ex vivo ve dnech 7, 14 a 21.



**Obrázek 16** V grafech je vynesena průměrná účinnost fluorescenčního záření ex vivo ve (A) slezině, (D) játrech, (G) ledvinách a (J) lymfatických uzlinách po aplikaci mananových konjugátů. Reprezentativní snímky FL ex vivo signálu po 7, 14 a 21 dnech od aplikace (B, E, H, K) MN nebo (C, F, I, L) MNOX. Na snímcích jsou zachyceny (B, C) sleziny, (E, F) játra, (H, I) ledviny a (K, L) lymfatické uzliny. Average Radiance=průměrná radiance; Day after injection=dny po injekční aplikaci. MN=MN\_IR\_DOTA-Gd; MNOX=MN\_POX\_IR\_DOTA-Gd

**Poznámka autora:** Veškeré obrázky v kapitole 6.2 pochází z článku Rabyk M, Galisova A, Jiratova M, Patsula V, Srbova L, Loukotova L, Parnica J, Jirak D, Stepanek P, Hruby M. Manan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *J Mater Chem B*. 2018 May 7;6(17):2584-2596. doi: 10.1039/c7tb02888a. Epub 2018 Jan 9. PMID: 32254477.

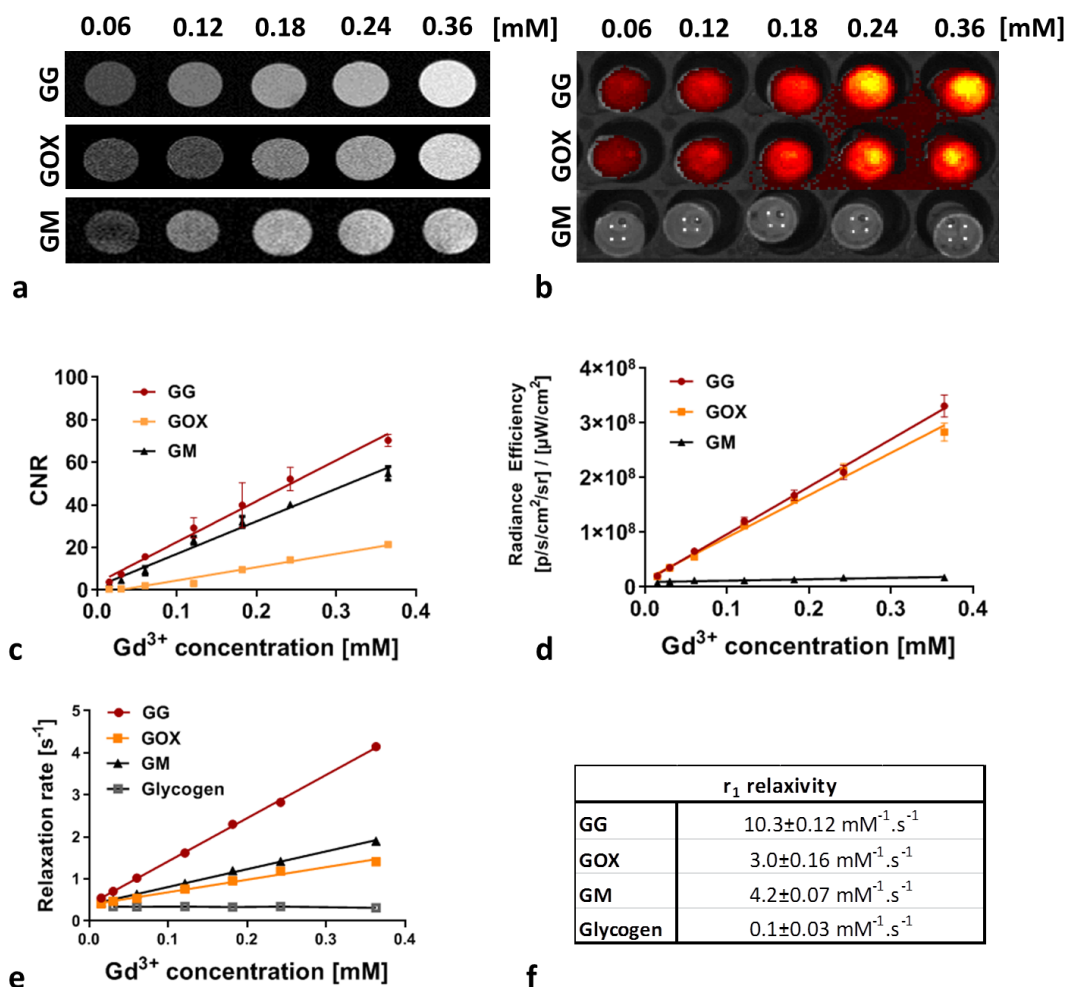
### 6.3 Glykogen jakožto výhodný polymerní nosič v nádorové theranostice: přímý *in vivo* důkaz

Gálišová A, **Jiráťová M**, Rabyk M, Sticová E, Hájek M, Hrubý M, Jiráček D. Sci Rep. 2020 Jun 26;10(1):10411.

**Podíl na publikaci:** experimentální část (kultivace buněk a indukce nádorů ve zvířecím modelu, fluorescenční zobrazování *in vivo* a *ex vivo*), analýza výsledků z fluorescenčního zobrazování, podíl na přípravě manuskriptu

Byly nasyntetizovány dvě varianty konjugátů na bázi glykogenu s fluorescenční značkou IR800CW, a to konjugát modifikovaný pomocí POX (dále označovaný jako GOX) a konjugát bez této modifikace (dále označovaný jako GG). Komerčně dostupná kontrastní látka pro MR gadoterate meglumine (GM = Dotarem), pak sloužila jakožto kontrola v provedených experimentech. MR charakteristiky konjugátů byly otestovány pomocí MRI (4.7 T) a relaxometrie (0.5 T), hodnoty  $T_1$ -váženého MR signálu a příslušné CNR hodnoty byly lineárně závislé na koncentraci  $Gd^{3+}$  v konjugátech (Obrázek 17a, c), nejvyšší signál byl naměřen pro GG. Relaxivita GG konjugátu ( $10.3 \pm 0.12 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) byla vyšší než relaxivita kontrolního GM ( $4.2 \pm 0.07 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) i než relaxivita POX modifikovaného glykogenového konjugátu GOX ( $3.0 \pm 0.16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Obrázek 17e, f). Relaxivita změřená pro nativní glykogen bez modifiací byla  $0.1 \pm 0.03 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Obrázek 17e, f). Vyšší CNR hodnoty pro GG a GOX ve srovnání s GM odráží vyšší  $r_1$  relaxivitu glykogenových konjugátů. Emise fluorescenčního signálu jednotlivých prób byla měřena po excitaci vlnovou délkou 745 nm. Zatímco glykogenové konjugáty s navázanou fluorescenční značkou (IR800CW) emitovaly silný fluorescenční signál, který byl lineárně závislý na jejich koncentraci v roztoku, kontrolní próba (GM) nevykazovala žádný fluorescenční signál po excitaci (Obrázek 17b, d). Fluorescenční signál GG i GOX byl srovnatelný.





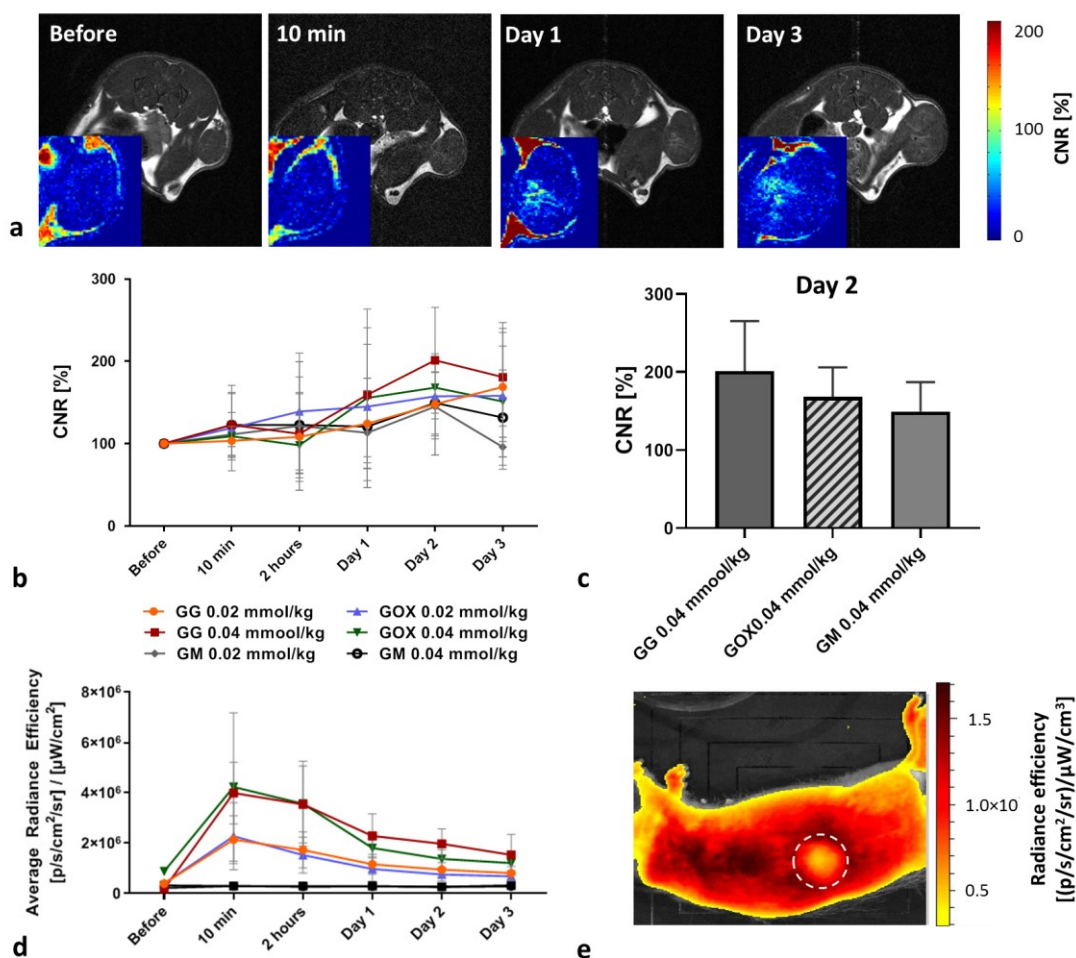
**Obrázek 17** Charakterizace glykogenových konjugátů: (a) MR a (b) fluorescenční snímky glykogenových konjugátů v pěti různých ředěních dle koncentrace  $Gd^{3+}$ , (c) graf příslušných hodnot CNR (poměr kontrastu k šumu, contrast-to-noise ratio) a (d) hodnot průměrné účinnosti fluorescenčního záření. (e) graf závislosti MR relaxační rychlosti  $r_1$  v závislosti na koncentraci  $Gd^{3+}$  v roztoku s naředěným glykogenovým konjugátem a (f) příslušné  $r_1$  relaxivity měřené na 0.5 T. Radiance Efficiency=míra radiance; Relaxation rate=rychlost relaxace;  $r_1$  relaxivity= $r_1$  relaxivita; Glycogen=glykogen.

Po *in vivo* aplikaci konjugátů jsme analyzovali biodistribuci a akumulaci GG, GOX a GM za použití MRI a *in vivo* fluorescenčního zobrazování (Obrázek 18). MR experimenty a následně vypočtené hodnoty CNR z těchto měření, ukázaly, že se glykogenové konjugáty (GG a GOX) akumuluji v tumorech ve vyšší míře než kontrolní GM (Obrázek 18b). Nejvyšší hodnoty CNR po celou dobu experimentu vykazovala skupina s injikovaným GG (Obrázek 18b, c). CNR pro GOX skupinu bylo nižší než pro GG skupinu, ale dosahovalo vyšších hodnot, než byly hodnoty kontrolní GM skupiny (Obrázek 18c). Nejvyšší akumulace práb byla zaznamenána druhý den po jejich aplikaci (Obrázek 18b, c). Hodnoty CNR pro GG o koncentraci 0.02 mmol/kg, a tedy i akumulace konjugátu, ještě stoupaly i mezi druhým a třetím dnem od aplikace. Nicméně tento nárůst

byl v mezích SD a nebyl statisticky signifikantní. Výsledky ukázaly, že hodnoty CNR s vyšší použitou koncentrací konjugátů dosahovaly vyšších hodnot (Obrázek 18b). Protože kontrolní skupina GM měla nižší hodnoty signálu z nádoru po celou dobu experimentu, můžeme usuzovat na úspěšné cílení GG a GOX do nádorové tkáně. Analýza pomocí CNR mapy ukázala, že MR signál byl zvýšený především ve středu nádoru (Obrázek 18a). Pro potvrzení, že MR signál byl zvýšený díky akumulaci glykogenových konjugátů, a ne kvůli tukové tkáni, která má také pozitivní signál na T<sub>1</sub>-vážených MR snímcích, jsme provedli histologickou analýzu nádorů. Histologická analýza vyloučila přítomnost fibrózy a steatózy v nádorech. Byla nalezena pouze nekróza v centrech některých nádorů.

Akumulace GG a GOX v nádorové tkáni byla také potvrzena pomocí *in vivo* fluorescenčního zobrazování (Obrázek 18e). Fluorescenční signál GG i GOX po prvním dnu ode dne aplikace rychle klesal (Obrázek 18d), proto není v tomto případě fluorescenční zobrazování vhodné pro analýzu dlouhodobých změn akumulace glykogenových konjugátů. Nicméně hodnoty fluorescenčního signálu pro skupiny GG a GOX (o koncentraci 0.04 mmol/Gd<sup>3+</sup>/kg) zůstávaly nad hodnotami před aplikací konjugátů i třetí den od jejich podání.

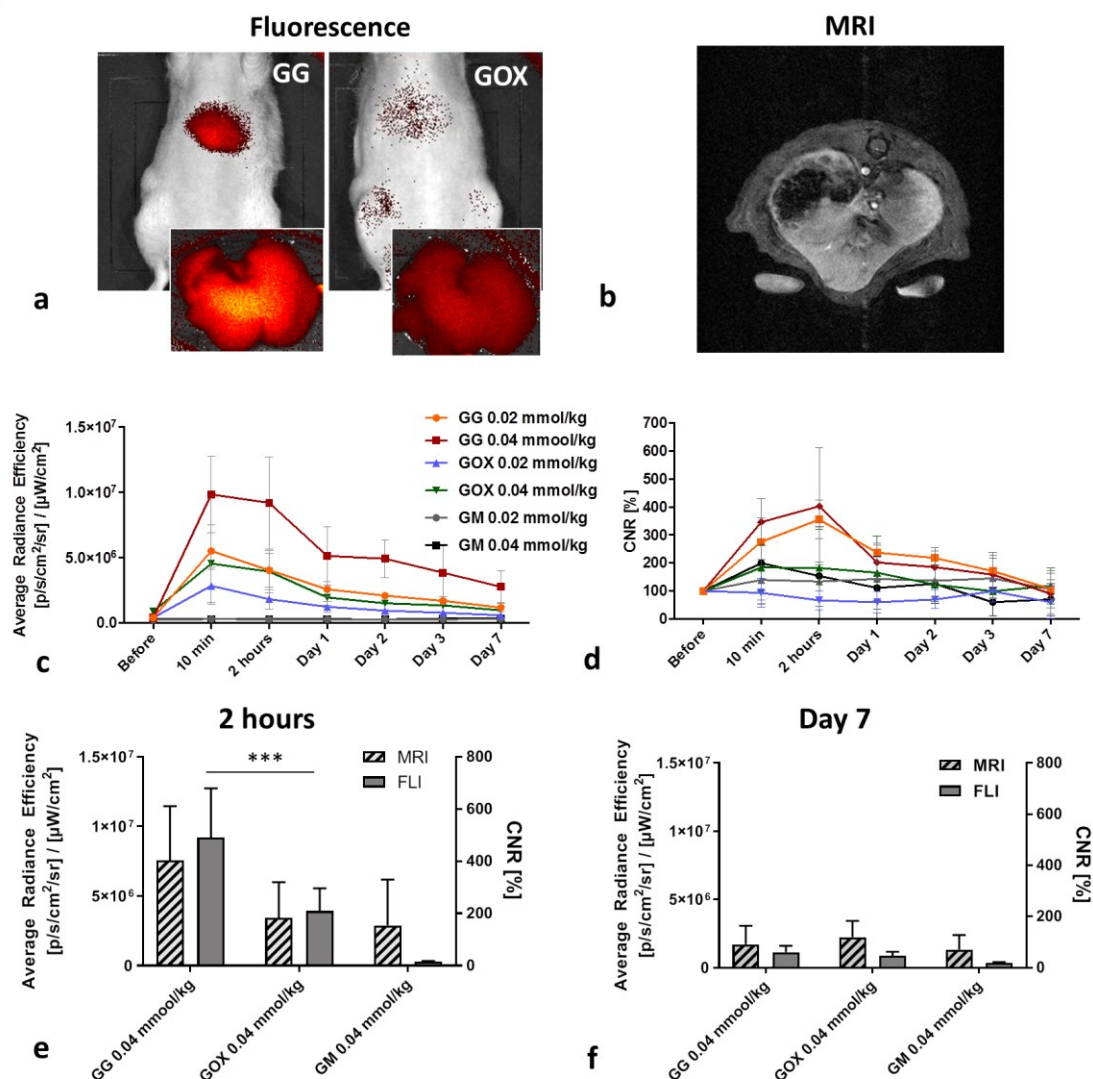




**Obrázek 18** Akumulace konjugátů na bázi glykogenu v tumoru: (a) T1-vážené snímky potkanů, kterým bylo injikováno glykogenové konjugáty; vložené CNR mapy pro příslušné snímky ukazují akumulace glykogenových konjugátů ve vnitřní části tumoru; (b) kvantifikace MR signálu z tumoru před a po injekci glykogenových konjugátů; (c) CNR hodnoty v tumoru 2 dny po injekci glykogenových konjugátů/GM; (d) graf zobrazující fluorescenční signál pocházející z místa nádoru v různých časových bodech po aplikaci; (e) reprezentativní snímek potkana injikovaného GG, tumorová oblast je vyznačena přerušovanou bílou čarou (kruh). Before=před; Day=den; Average Radiance Efficiency=průměrná účinnost záření; Radiance efficiency=hodnota (účinnost) záření.

Testované konjugáty se akumulovaly také v játrech. Vyšší hodnoty MRI i FL signálu byly pozorovány z jater u skupin injikovaných GG. GOX skupiny vykazovaly nižší hodnoty po celou dobu experimentu ( $p < 0.05$ , párový t-test) (Obrázek 19). Nejvyšší akumulace byla dosažena dvě hodiny po *i.v.* aplikaci, přičemž GG měl akumulaci na signifikantně vyšších hodnotách než GOX ( $p = 0.0001$ ) (Obrázek 19f). Hodnoty MR signálu klesly na předaplikační úroveň sedmý den po injekci konjugátů, nicméně GG skupiny stále vykazovaly mírně zvýšený signál z oblasti jater (Obrázek 19d). Obě komplementární zobrazovací metody (MRI a FLI) ukázaly obdobný trend v průběhu a

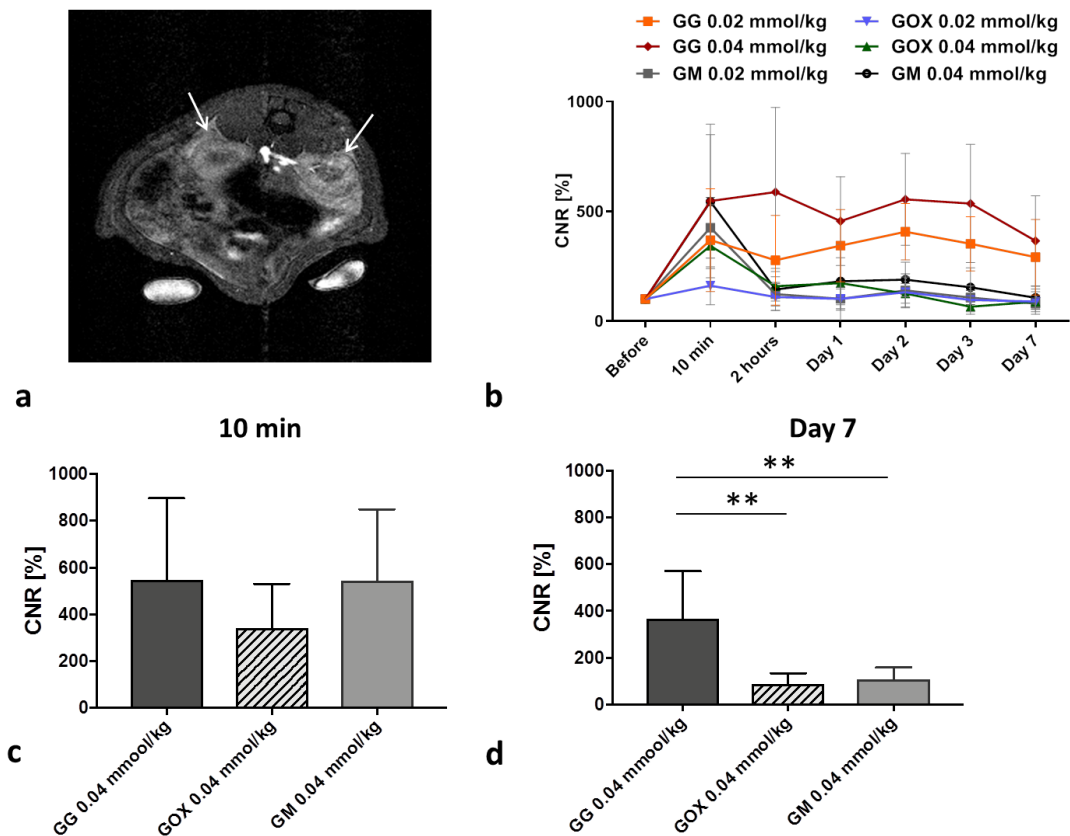
změnách signálu z jater (Obrázek 19e, f). Akumulace signálu v játrech z komerčně dostupného GM byla pozorována pouze během prvního dne po aplikaci.



**Obrázek 19** Akumulace glykogenových konjugátů v játrech: reprezentativní (a) fluorescenční (b) MR snímky signálu z jater potkanů, kterým byly aplikovány glykogenové konjugáty, (a,b) vložené snímky zobrazují detailní ex vivo fluorescence jater; (c) kvantifikace fluorescenčního signálu a (d) MR hodnoty CNR z jater potkanů v různých časových bodech po podání glykogenových konjugátů/gadoterate megluminu; fluorescenční a MR signál (e) 2 hodiny a (f) 7 dní po injekci kontrastních látek ukazuje na rozdíly ve výši signálu mezi jednotlivými typy kontrastních prób v nejvyšších koncentracích (0.04 mmol Gd<sup>3+</sup>/kg). Fluorescence=fluorescence; Average Radiance Efficiency=průměrná účinnost záření; 2 hours=dvě hodiny; Day=den.

Kvůli atenuaci fluorescenčního signálu v hlouběji uložených orgánech, byla analýza akumulace prób v ledvinách provedena pouze pomocí MRI. Signál z GM skupiny a GOX skupiny klesl k původním (nativním) hodnotám již po dvou hodinách od aplikace prób. Signál u GG skupiny byl signifikantně vyšší než u GOX a GM skupiny a byl nad předaplikačními hodnotami po celou dobu experimentu, a to i u skupiny s nižší

GG koncentrací (Obrázek 20b). Pro skupinu GM byl signál z ledvin pozorován pouze ihned po aplikaci.



**Obrázek 20** Akumulace glykogenových konjugátů v ledvinách: (a) reprezentativní MR snímek ledvin (označeny šipkami) po aplikaci GG; (b) CNR hodnoty v čase po aplikaci kontrastních prób; (c, d) kvantifikace CNR hodnot pocházející z prób aplikovaných o nejvyšší koncentraci (0.04 mmol Gd3+/kg) ve dvou časových bodech – (c) po 10 minutách a (d) 7 dnech od aplikace. Before=před; Day=den.

Jak již bylo zmíněno, fluorescenční signál je limitovaný zeslabováním, a to především při průchodu z hlouběji uložených orgánů a tkání. Proto byla pro přesnější určení míry FL signálu z hlouběji uložených orgánů (jater, ledvin, sleziny a nádoru), a potvrzení výsledků z *in vivo*, provedena analýza fluorescenčního signálu *ex vivo* ve dvou časových bodech (den 2 a 7 po aplikaci prób).

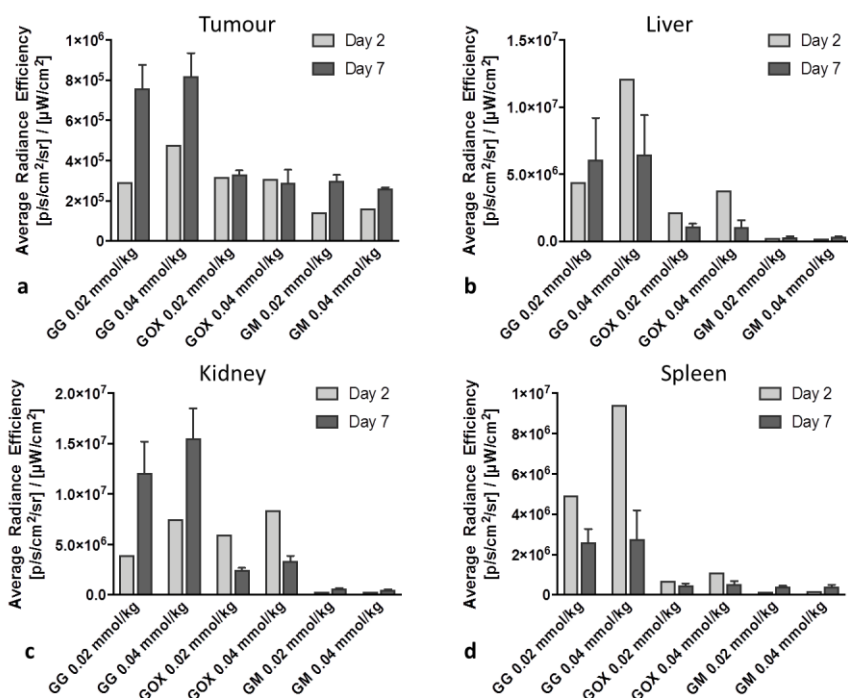
V souladu s našimi MRI *in vivo* daty, *ex vivo* FLI analýza ukázala, že GG se kontinuálně akumuluje v nádoru, s nejvyšší mírou akumulace sedmý den od aplikace konjugátu (Obrázek 21a). Akumulace GOX v nádoru byla v den dva nižší než u GG skupin, což je také v souladu s daty získanými z *in vivo* měření. Akumulace GOX v nádoru, na rozdíl od GG, dosahovala v den dva i v den sedm obdobných hodnot. Fluorescenční signál nádorů u skupin GM a GOX byl v mezích signálu pozadí.

Mimo nejnižší koncentraci GG, byla akumulace konjugátů v játrech vyšší v den dva ve srovnání se dnem sedm (Obrázek 21b). Tyto výsledky jsou opět v souladu s *in vivo* výsledky.

Podobně jako u signálu z MR i FL *ex vivo* měření prokázalo, ve srovnání s GOX, vyšší akumulaci GG v ledvinách v sedmý den po aplikaci konjugátu. Signál v ledvinách u GG skupin byl vyšší v den sedm, u GOX skupin vykazoval vyšší hodnoty v den dva (Obrázek 21c). Rozdíl mezi MRI a FL signálem z ledvin v den dva může být vysvětlen nižší  $r_1$  relaxivitou GOX konjugátu a tím pádem i nižším  $T_1$  signálem na  $T_1$ -vážených MR snímcích. Nicméně i tak jsou FL *ex vivo* signály získané v den dva podobné a nevykazují signifikantní rozdíl.

Zpočátku (v den dva) byla zaznamenána akumulace GG ve slezině, GM a GOX se ve slezině neakumulovaly (Obrázek 21d). Přetrvávající nízký fluorescenční signál ve slezině byl u GG skupin zaznamenán i v den sedm (Obrázek 21d).

Obecně můžeme říci, že se GG konjugáty s delším časovým úsekem od aplikace více akumulovaly v nádorech a ledvinách. Naopak ve slezině signál klesal s delším časem od aplikace konjugátu. Obdobně i signál z jater klesal v čase u GOX skupin a GG skupiny s vyšší koncentrací.



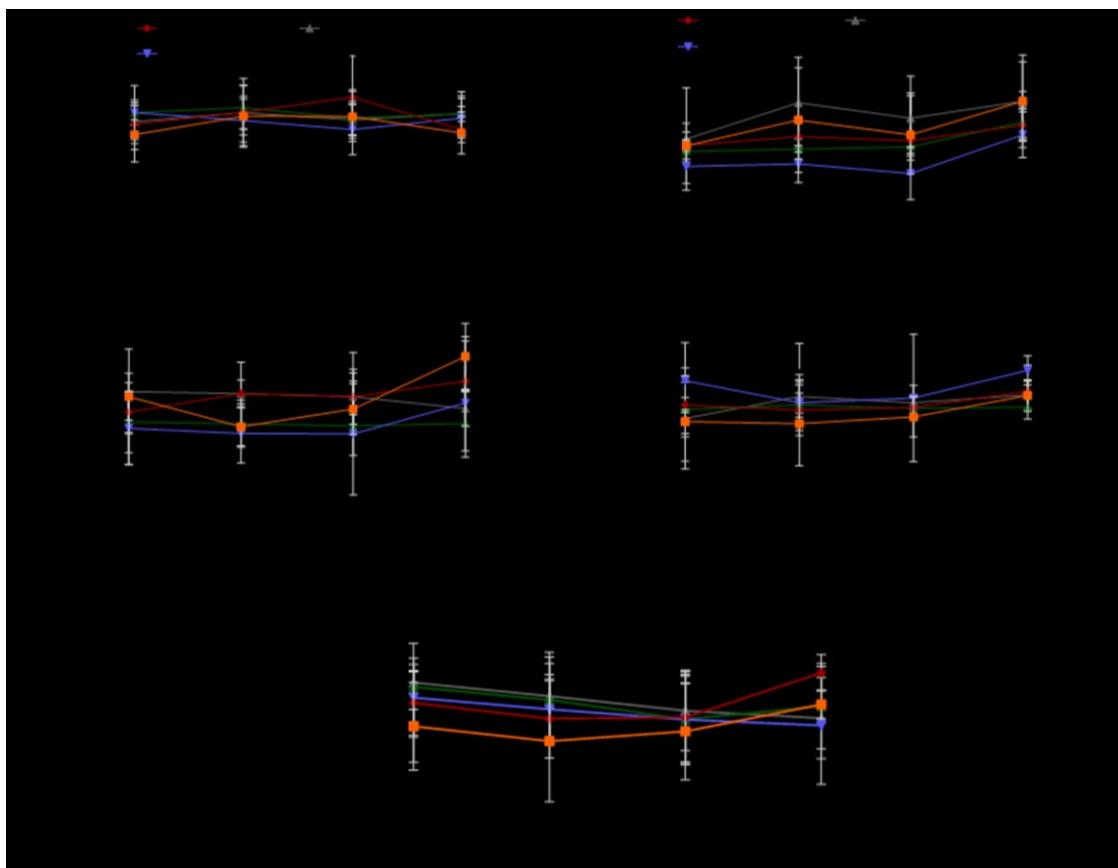
**Obrázek 21** Kvantifikace *ex vivo* fluorescenčního signálu v (a) nádoru (Tumour), (b) játrech (Liver), (c) ledvinách (Kidney) a (d) slezině (Spleen); fluorescenční signál u GG skupiny byl v nádoru a ledvinách vyšší sedmý den po aplikaci. Day=den; Average Radiance Efficiency=Průměrná účinnost záření.

Testy MTT neprokázaly toxicitu u žádného z glykogenových konjugátů. Hodnota absorbance při vlnové délce 570 nm odráží úroveň buněčné proliferace a životnosti. Hodnoty absorbance pak u HUH7 buněčné linie inkubované s GG nebo GOX dosahovaly podobných či lehce vyšších hodnot absorbance než u kontrolních buněk inkubovaných v médiu bez glykogenových konjugátů (Tabulka 1).

<b>Hodnoty absorbance při 570 nm (test MTT)</b>			
<b>Koncentrace (mM)</b>	<b>GG</b>	<b>GOX</b>	<b>Kontrola</b>
0.4	1.60±0.16	1.48±0.36	1.75±0.50
0.07	1.71±0.11	1.79±0.31	
0.014	1.55±0.26	2.14±0.70	
0.0028	2.14±0.53	2.26±1.08	

**Tabulka 1** Hodnoty absorbance při 570 nm pro MTT test cytotoxicity s GG a GOX. Kontrola představuje HUH7 buňky inkubované bez GG a GOX (pouze v inkubačním médiu).

Hodnoty ALT, bilirubinu, kreatinu a albuminu v séru byly v rozsahu fyziologických hodnot, což odráží dobrou kondici pokusných zvířat, která nevykazovala patologické změny těchto sérových hodnot. Hodnoty AST byly lehce zvýšeny po podání prób (včetně GM). Nicméně, je potřeba zmínit, že kontrolní zvířata bez indukovaných nádorů, také vykazovala lehce vyšší hodnoty AST. Proto může být toto konkrétní zvýšení podmíněno i použitým, vysoce specifickým, kmenem potkana (RNU kmen). Důležité je, že nebyly prokázány rozdíly v biochemických hodnotách měřených parametrů mezi kontrolní GM skupinou a skupinami, které dostaly glykogenové konjugáty (Obrázek 22).

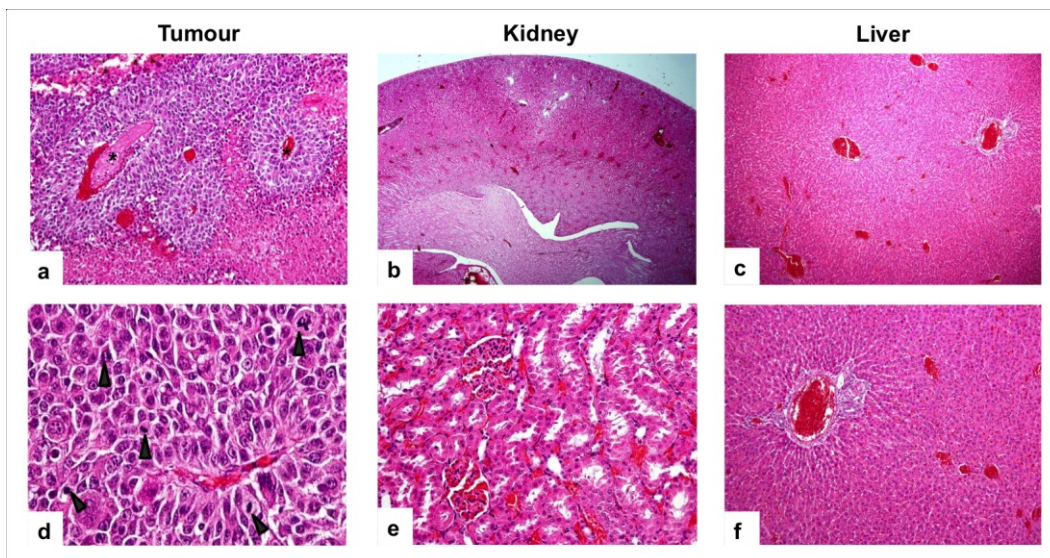


**Obrázek 22** Změny hladiny biochemických parametrů v krevním séru pokusných zvířat po aplikaci glykogenových konjugátů. Byly analyzovány hladiny (a) AST, (b) ALT, (c) bilirubinu, (d) kreatinu a (e) albuminu v krevním séru potkanů v několika časových bodech po i.v. aplikaci glykogenových konjugátů či GM. Oranžová linka představuje biochemické hodnoty v séru potkanů s indukovanými nádory, ale bez aplikace GG/GOX/GM. Bilirubin=bilirubin; Creatinine=kreatinin; Albumin=albumín.

Histologická analýza na konci experimentu nám sloužila pro potvrzení netoxického charakteru zkoumaných glykogenových konjugátů. Výsledky z histologie potvrdily absenci patologických změn v orgánech pokusných zvířat v GG a GOX skupinách (Obrázek 23). Nebyly prokázány nekroinflatorní změny ani steatóza nebo fibróza jaterní tkáně.

Výsledky testování glykogenových nosičů v souhrnu ukázaly, že jsou tyto nosiče akumulovány v tumorech ve větší míře než kontrolní GM, nezpůsobují patologické změny orgánů ani biochemických hodnot v séru a jsou proto perspektivní platformou pro nádorovou theranostiku.





**Obrázek 23** Histologické snímky nádorů a orgánů po administraci glykogenových konjugátů. (a) nádorová tkáň barvená hematoxylinem-eosinem (H&E) ukazující tumorovou tkáň s kofluentní koagulační nekrózou (zvětšení 400x). (d) Neoplastické buňky zobrazující signifikantní jaderné atypia se zvýšenou mitotickou aktivitou (označeno šipkami) (zvětšení 600x). (b,e) H&E barvení zobrazující renální parenchym (b, zvětšení 20x, e, zvětšení 400x) a (c,d) jaterní tkáň (c, zvětšení 40x, d, zvětšení 100x), které si zachovaly původní architekturu bez znatelných patologických změn po aplikaci glykogenových konjugátů. Tumour=nádor; kidney=ledviny; liver=játra.

**Poznámka autora:** Veškeré obrázky v kapitole 6.3 pochází z článku Gálisová A, Jirátová M, Rabyk M, Sticová E, Hájek M, Hrubý M, Jiráček D. Glycogen as an advantageous polymer carrier in cancer theranostics: Straightforward in vivo evidence. *Sci Rep.* 2020 Jun 26;10(1):10411. doi: 10.1038/s41598-020-67277-y. PMID: 32591567; PMCID: PMC7320016.

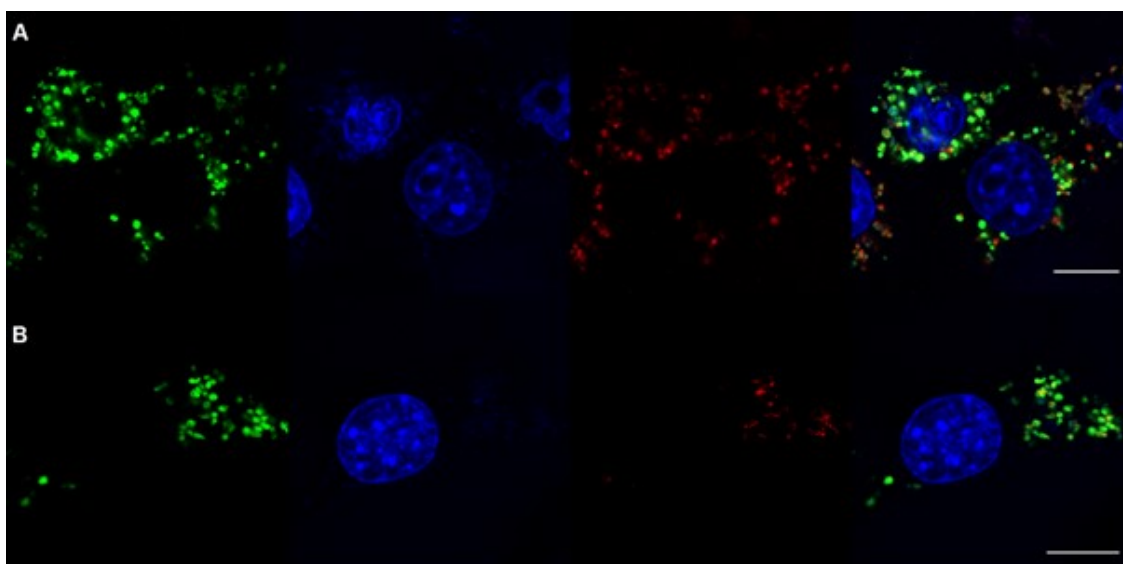
## 6.4 Nanodiagnostické látky na bázi mananu pro cílení sentinelových lymfatických uzlin a nádorů

**Jiráto**vá M, Gálisová A, Rabyk M, Sticová E, Hrubý M, Jirák D. Mannan-Based Nanodiagnostic Agents for Targeting Sentinel Lymph Nodes and Tumors. *Molecules*. 2020 Dec 31;26(1):146.

**Podíl na publikaci:** design biologických experimentů, experimentální část (provedení konfokální mikroskopie a testu MTT, kultivace buněk a indukce nádorů ve zvířecím modelu, fluorescenční zobrazování (*in vivo* a *ex vivo*), analýza výsledků z fluorescenčního zobrazování a MR zobrazování, statistická analýza výsledků, příprava manuskriptu

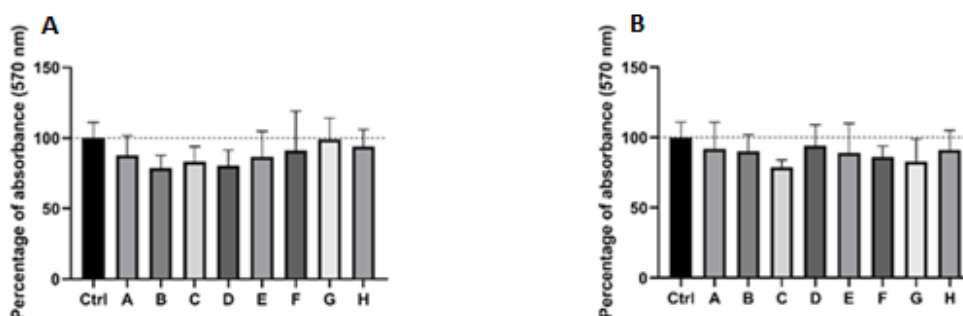
Za účelem určení vnitrobuněčné lokalizace mananových konjugátů byly 4T1 buňky inkubovány se zelenou fluorescenční barvou pro lysozomy (LysoTracker® Green), fluorescenční barvou pro jádra v modrém spektru (Hoechst 33342) a s mananovými konjugáty s navázanou barvou IR800CW, která emituje signál v červeném spektru. Konfokální fluorescenční mikroskopie ukázala, že buňky inkubované s MNOX vykazovaly nižší fluorescenční signál v červeném spektru při použití stejné koncentrace jako u MN (Obrázek 24). Pearsonův koeficient, který hodnotí kolokalizaci dvou markerů, byl vypočítán na základě překryvu fluorescenčního signálu z červeného a zeleného spektra (IR800CW a LysoTracker® Green), vykazoval nižší hodnoty pro MNOX (konkrétně pak 0.324 pro MNOX a 0.428 pro MN). Nižší hodnoty signálu reflektují nižší akumulaci MNOX varianty konjugátu ve srovnání s variantou MN.





**Obrázek 24** Reprezentativní snímky z konfokální mikroskopie: (A) 4T1 buňky inkubované s MN-DOTA Gd-IR800CW (MN), LysoTracker® Green a Hoechst 33342; (B) 4T1 buňky inkubované s MN-PMeOx-DOTA Gd-IR800CW (MNOX), LysoTracker® Green a Hoechst 33342. Z prava do leva: LysoTracker® Green (zelený signál), Hoechst 33342 (modrý signál), MN nebo MNOX (červený signál pocházející z fluorescenční barvy IR800CW), proložené signály ze všech kanálů. Měřítka v obrázku představuje 10  $\mu\text{m}$ .

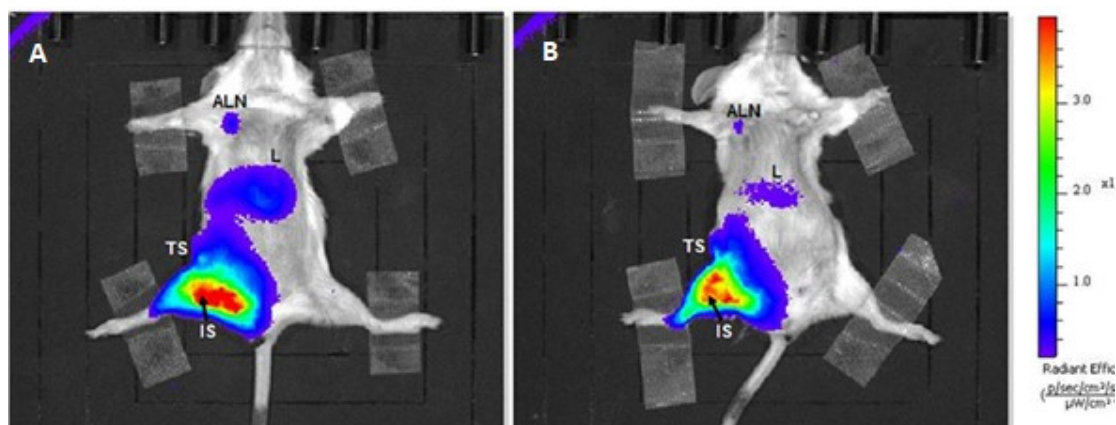
Kvůli potřebě prokázat netoxický charakter manových nosičů pro jejich budoucí využití jakožto nosiče léčiv, jsme provedli MTT test. Výsledky tohoto testu ukazují, že oba typy mananových konjugátů nemají negativní vliv na proliferaci a životnost 4T1 buněk (Obrázek 25). Rozdíly v životnosti a proliferaci mezi kontrolními buňkami a buňkami s přidáním MN nebo MNOX nebyly ani v jednom případě signifikantní ( $p \geq 0.05$ ). I nejvyšší použitá koncentrace, která odpovídala MN a MNOX naředěným tak, aby roztoky obsahovaly 4.5 mM  $\text{Gd}^{3+}$ , nevykazovala cytotoxický efekt.



**Obrázek 25** Výsledky MTT testu pro 4T1 buněčnou linii inkubovanou 24 hodin s: (a) MN nebo; (b) MNOX. A-H reprezentují různé koncentrace MN a MNOX. Sloupec A představuje nejvyšší použitou koncentraci (4.5 mM  $\text{Gd}^{3+}$ ), která byla použita pro následnou pětikovou ředící řadu, a to až po nejnižší koncentraci, kterou zobrazuje sloupec H. Data jsou zobrazena jako průměrné procento ( $\pm\text{SD}$ ) absorbance ( $n=4$ ), 100 % je průměrná hodnota buněk bez jakéhokoli přidávaného konjugátu (kontrolní buňky – Ctrl). Percentage of absorbance=procento absorbance.

Po *in vitro* testech jsme provedli *in vivo* testy na myších kmene *Balb/c* s indukovanými orthotopickými nádory mamárních žláz. Po nárůstu nádorů byla zvířata náhodně rozděla do tří skupin – MN, MNOX a GM. Po aplikaci *i.m.* mananových konjugátů či GM byla opakovaně měřena *in vivo* fluorescence v několika předem určených časových bodech. Sledování fluorescence umožnilo charakterizovat biodistribuci, degradaci a rychlost eliminace podaných prób. Data z těchto měření nám ukázala, jak jsou mananové konjugáty distribuovány v lymfatických uzlinách po jejich absorpci z místa aplikace.

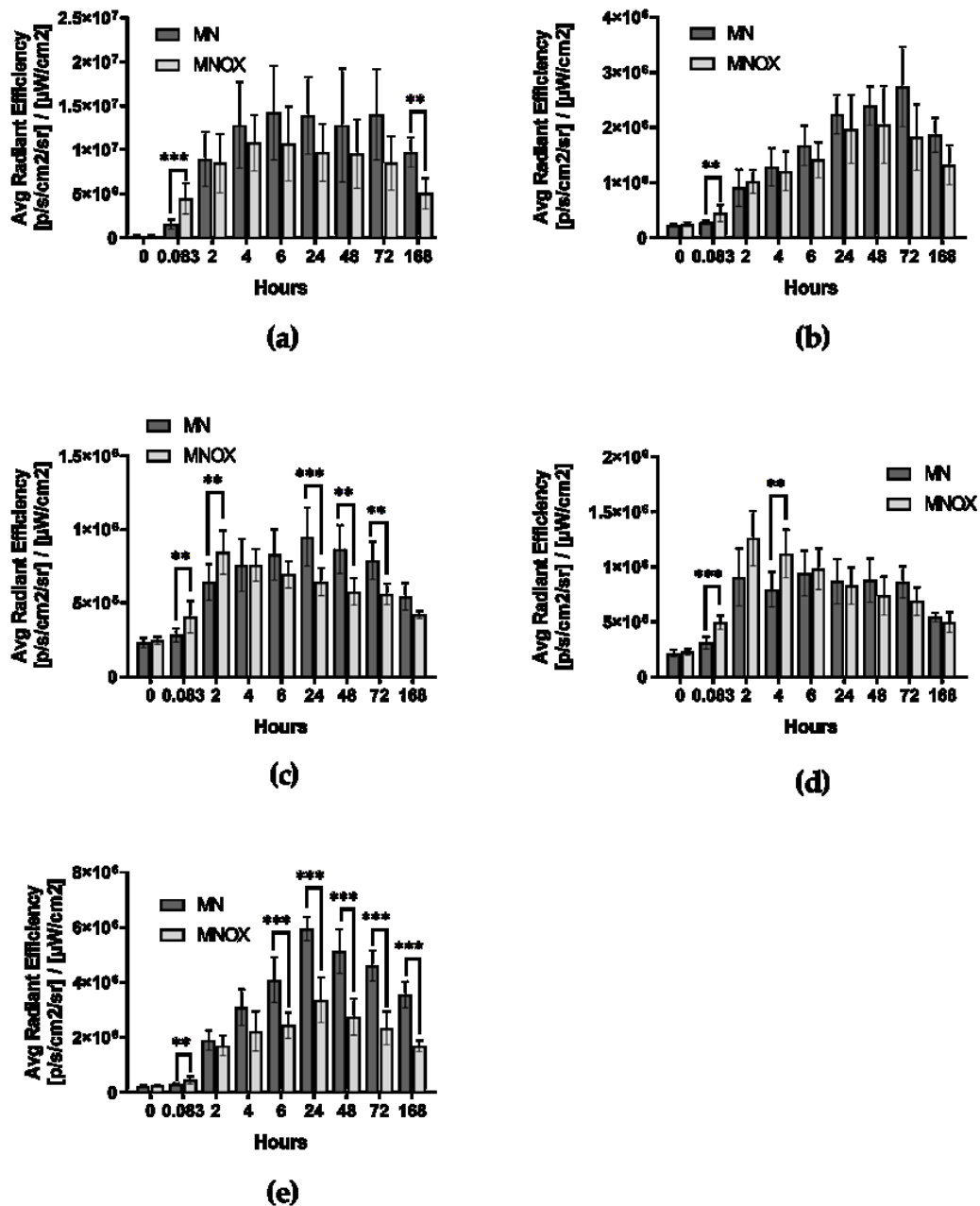
Dle výsledků z opakovaných měření fluorescenčního signálu *in vivo* po podání MN a MNOX (Obrázek 26), můžeme konstatovat, že nejvyšší signál pochází z inguinální lymfatické uzliny u místa nádoru a aplikace, tedy ze SLN (Obrázek 27a). Fluorescenční signál dosáhl svého maxima u MN i MNOX skupiny mezi 4 a 24 hodinou od aplikace konjugátů a byl vyšší u MN skupiny. Druhý nejvyšší fluorescenční signál pocházel z oblasti jater (Obrázek 27e) s maximem ve 24 hodinách po aplikaci MN či MNOX. Po dosažení maxima signál z oblasti jater kontinuálně klesal až do ukončení experimentu. Signál z oblasti jater dosahoval vyšších hodnot u MN skupiny ve srovnání s MNOX skupinou. GM skupina měla pokaždé hodnoty fluorescence srovnatelné s hodnotami pozadí (šumu), proto není zahrnována do analýzy fluorescenčního signálu.



**Obrázek 26** Vzorové snímky z měření *in vivo* fluorescence u (A) MN a (B) MNOX skupiny. Fluorescenční signál z axilární lymfatické uzliny (ALN), jater (L), místa nádoru (TS) a injekčního místa (IS). Snímky zobrazují myši tři dny po *i.m.* podání (A) MN nebo (B) MNOX.

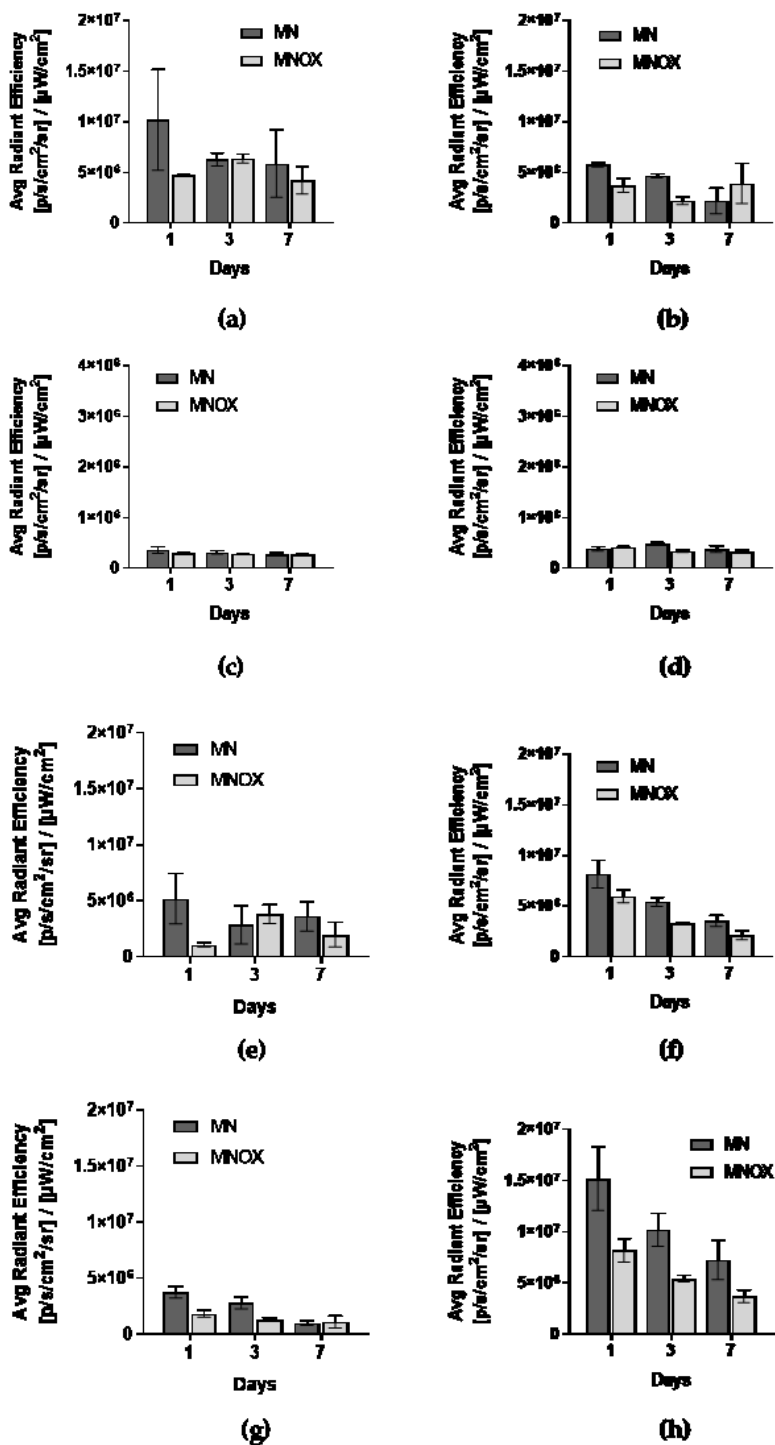
Později v čase jsme zaznamenali fluorescenční signál pocházející z axilární lymfatické uzliny na straně nádoru (Obrázek 27b), který dosáhl maxima 48 hodin po aplikaci MNOX a 72 hodin po aplikaci MN. Nejnižší námi hodnocený fluorescenční signál pocházel axilární lymfatické uzliny na nenádorové straně zvířat (Obrázek 27c), nicméně nejvyšších hodnot fluorescenčního signálu z této ROI bylo dosaženo již po

relativně krátkém časovém úseku a to dvou hodinách od aplikace mananových konjugátů, dále v čase pak hodnota tohoto konkrétního signálu již jen klesala.



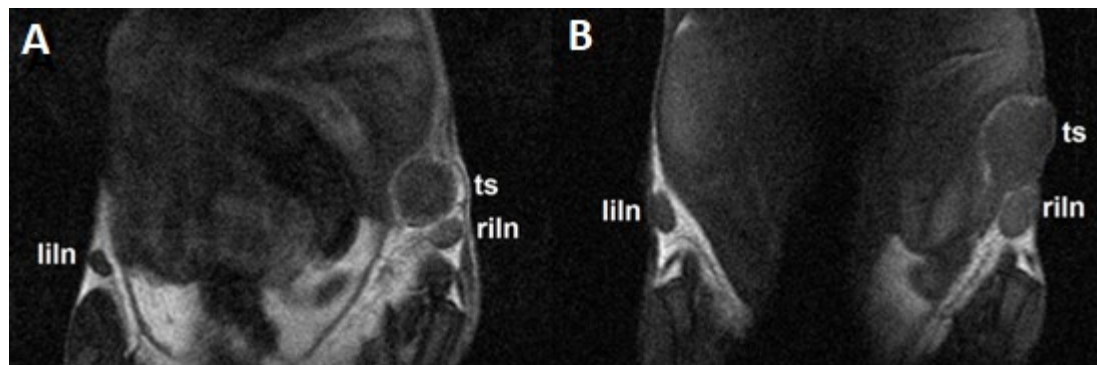
**Obrázek 27.** Kvantifikace fluorescenčního *in vivo* signálu v různých časových intervalech. Signál byl kvantifikován z (a) SLNs (inguinální lymfatické uzliny na straně, kde byl indukován nádor), (b) axilární lymfatické uzliny na straně, kde byl indukován nádor, (c) axilární lymfatické uzliny na straně, na které nebyl indukovaný nádor, (d) inguinální lymfatické uzliny na straně, na které nebyl indukovaný nádor a (e) jater. Pro statistickou evaluaci byl použit dvouvýběrový t-test ( $n=9$  pro MN skupinu a  $n=9$  pro MNOX skupinu). Fluorescenční signál je zobrazen jako průměrná účinnost záření (průměr  $\pm$  SD),  $p$ -hodnoty: \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . Avg Radiance Efficiency = průměrná účinnost záření; Hours = hodiny.

Fluorescenční signál z orgánů uložených hlouběji v těle zvířete (zvláště z ledvin a sleziny) nemůže být kvůli optické atenuaci změřen buď vůbec nebo velmi nepřesně, proto jsme signál z těchto i dalších orgánů měřili *ex vivo* (Obrázek 28). Fluorescenční signál z analyzovaných orgánů klesal postupně s časem měření (1, 3 a 7 dní od aplikace konjugátů). Vyjímkou z tohoto pravidla byly axilární i inguinální lymfatické uzliny na straně nádoru a nádor u MNOX skupiny, kde pokles nebyl kontinuální. Signál byl až na dvě výjimky (nádor v den tři a axilární lymfatická uzlina na straně nádoru v den sedm) vždy vyšší u MN skupiny. U MNOX skupiny byl pozorován nižší fluorescenční signál, a to zejména z ledvin (Obrázek 28f), sleziny (Obrázek 28g) a jater (Obrázek 28h). Nicméně trend kontinuálního poklesu fluorescenčního signálu s časem u těchto tří orgánů byl stejný jako pro MN skupinu i u MNOX skupiny. Signál z nádoru byl nejvyšší v den jedna po aplikaci konjugátů u MN skupiny a v den tři po aplikaci u MNOX skupiny (Obrázek 28e), což ukazuje na pomalejší akumulaci a nižší biodegradaci díky konjugaci s POX. Obecně bylo pozorováno zpoždění akumulace fluorescenční próby v tumoru u MNOX skupiny.



**Obrázek 28** Kvantifikace ex vivo fluorescenčního signálu. Fluorescenční signál byl kvantifikován pro (a) SLNs, (b) axilární lymfatické uzliny na straně aplikace nádoru, (c) axilární lymfatické uzliny na nenádorové straně, (d) inguinální lymfatické uzlině na nenádorové straně, (e) oblast nádoru, (f) ledviny, (g) sleziny a (h) játra. Fluorescenční signál je vyneseno jako průměrná účinnost záření (průměr ± SD). Pro statistickou evaluaci byl použit dvouvýběrový t-test ( $n=9$  pro MN skupinu,  $n=9$  pro MNOX skupinu). Avg Radiance Efficiency=průměrná účinnost záření; Days=dny.

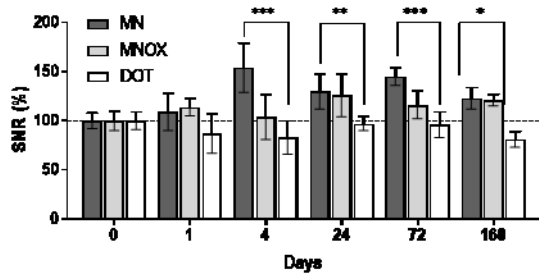
Jako komplementární zobrazovací metody k měření fluorescence bylo použito v klinické i experimentální praxi standardně využívané neinvazivní MR zobrazování ( $^1\text{H}$ -MRI). U MRI na rozdíl od FLI nedochází k atenuaci signálu z anatomicky hlouběji uložených orgánů. Při měření jsme se zaměřili na tři anatomická místa, a to na obě inguinální lymfatické uzliny a na nádor (Obrázek 29).



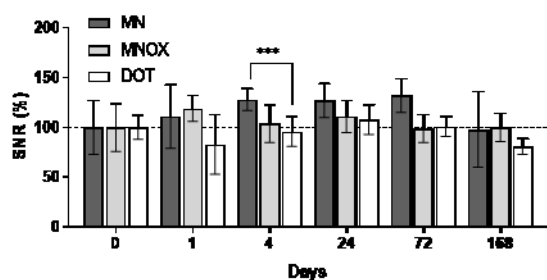
**Obrázek 29** Reprezentativní koronární MR obrázky měřené tři dny po injekci (A) MN nebo (B) MNOX do pravého stehenního svalu. Levá inguinální lymfatická uzlina (liln), nádor (ts) a pravá inguinální lymfatická uzlina (riln) jsou ve snímcích vyznačeny a představují místa akumulace aplikovaných polymerů.

Výsledky z MRI potvrdily výsledky získané fluorescenčním měřením, konkrétně preferenční nahromadění obou polymerních konjugátů v SLN, se signifikantně vyšší akumulací v případě MN a MNOX skupiny v porovnání s kontrolní GM skupinou (Obrázek 30). Analýza MR měření ukázala, že nejvyšší akumulace  $\text{Gd}^{3+}$  byla naměřena v obou inguinálních uzlinách u MN skupiny. Maximum akumulace mananových konjugátů v SLN bylo pozorováno po čtyřech hodinách od aplikace MN a po 24 hodinách od aplikace MNOX, což je srovnatelné s výsledky z FLI. Přestože akumulace mananových konjugátů v nádorech byla méně výrazná, než akumulace v SLN maxima dosáhla již po jedné hodině od aplikace manových polymerů (Obrázek 30c).

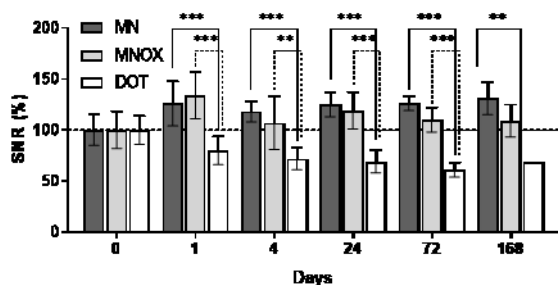
Zobrazovací účinnost MN o nižší molekulové hmotnosti byla signifikantně vyšší ve srovnání s MNOX o vyšší molekulové hmotnosti (modifikace stejného mananu POX zvyšuje molekulovou hmotnost výsledného konjugátu). Toto může poukazovat na preferenci cílicího efektu pomocí interakce s mananovým DC-SIGN receptorem, oproti méně specifickému a méně účinnému cílení nádoru pomocí efektu EPR.



(a)



(b)



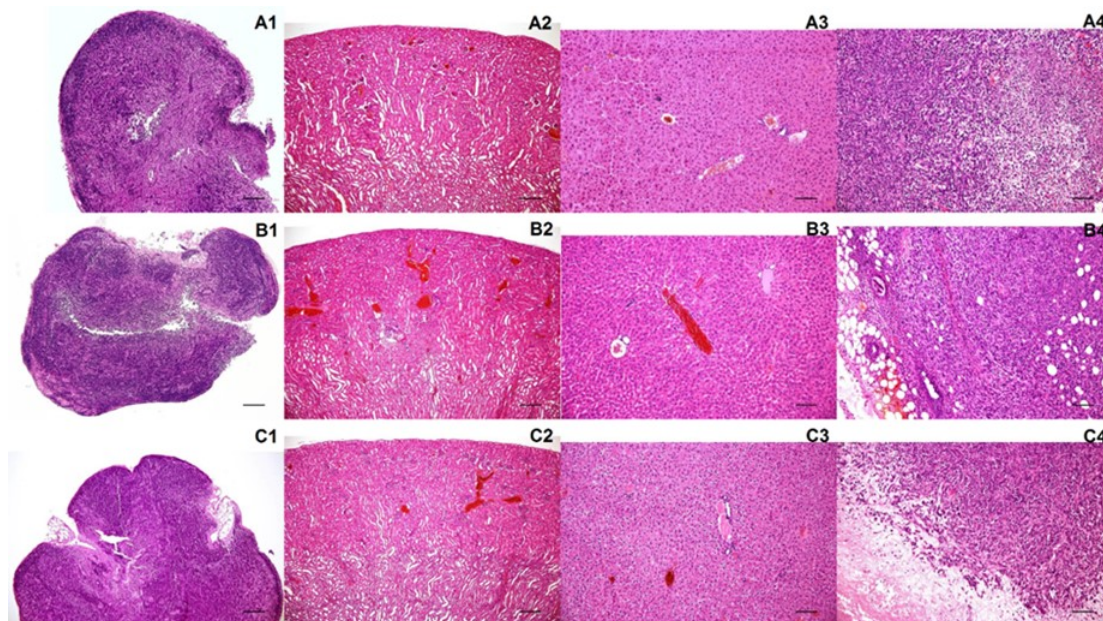
(c)

**Obrázek 30** Kvantifikace MR měření. Výsledky jsou zobrazeny jako průměr SNR v procentech  $\pm$  SD. 100 % SNR představuje měření, které bylo provedeno před aplikací kontrastních látek. Grafy znázorňují výsledky z (a) inguinálních lymfatických uzlin, (b) inguinálních lymfatických uzlin na straně orthotopického nádoru (SLNs) a (c) nádorů. Pro statistickou evaluaci byl použit jednovýběrový t-test ( $n=9$  pro MN skupinu,  $n=9$  pro MNOX skupinu,  $n=6$  pro GM skupinu),  $p$ -hodnota: \*\*\*  $p<.001$ , \*\*  $p<0.01$ , \*  $p<0.05$ . Days=dny; DOT=GM skupina (GM=Gadoterate meglumine/Dotarex).

Histologická analýza byla provedena na konci experimentů s cílem vyloučit možný nežádoucí vliv mananových konjugátů na orgány s případnou tvorbou patologických změn a dále s cílem detailně charakterizovat indukované nádory. Žádné patologické makroskopické změny nebo patologické změny viditelné pomocí světelného mikroskopu nebyly pozorovány v žádném z vyšetřovaných orgánů (Obrázek 31). Světelná mikroskopie ukázala, že tkáňové uspořádání bylo zachováno bez znaků



dystrofických/degenerativních změn, zánětlivě nekrotických změn nebo fibrózy. Ve vyšetřovaných orgánech nebyly pozorovány žádné neočekávané neoplastické procesy (Obrázek 31A1-A3, B1-B3 a C1-C3). Histologické vyšetření indukovaných nádorů ukázalo neohraňčené oblasti špatně diferenciovanych, atypicky neoplastických buněk s hyperchromatickými jádry, zejména se zvýšenými jaderně-cytoplazmatickými poměry, vysokou mitotickou aktivitou a atypickou mitózou. Také byly identifikovány oblasti koagulatívni atypické nekrózy v rámci neoplastické tkáně (Obrázek 31A4, B4 a C4).



**Obrázek 31** Reprezentativní histologické snímky. Snímky A1-A4 představují orgány ze skupiny, které byl podán MN; B1-B4 jsou snímky ze skupiny, které byl podán MNOX; C1-C4 znázorňují snímky ze skupiny, které byl podán GM. V rámci histologické analýzy byly zkoumány následující orgány: lymfatické uzliny (A1, B1, C1), ledviny (A2, B2, C2), játra (A3, B3, C3) a nádory (A4, B4, C4). Použito bylo barvení hematoxylinem-eosinem a měřítko ve snímcích A1-A3, B1-B3, C1-C3 představuje 100x zětšení, ve snímcích A4, B4 a C4 pak 400x zvětšení.

Testování konjugátů na bázi mananu, cílených do SLN a nádorů, ukázalo, že oba typy konjugátů (MN i MNOX) jsou netoxické, nezpůsobují patologické změny orgánů, a že maximální naměřený signál pochází ze SLN. Z toho lze usuzovat, že se konjugáty v SLN i preferenčně akumulují. K akumulaci v nádorech také dochází, nicméně v menší míře než v SLN.

**Poznámka autora:** Veškeré obrázky v kapitole 6.4 pochází z článku Jirátová M, Gálisová A, Rabyk M, Sticová E, Hrubý M, Jirák D. Mannan-Based Nanodiagnostic Agents for Targeting Sentinel Lymph Nodes and Tumors. *Molecules*. 2020 Dec 31;26(1):146. doi: 10.3390/molecules26010146. PMID: 33396204; PMCID: PMC7795445.



## 7 Diskuse

### 7.1 Glykogenové konjugáty

V první části testování glykogenových konjugátů (kapitola 6.1) jsme nejprve charakterizovali jejich biologické vlastnosti. Byla stanovena jejich lokalizace v buňkách, typ endocytózy, který buňky využívají pro pohlcení endogenně podaného glykogenu, a také míra cytotoxicity.

Konfokální mikroskopie testovala lokalizaci glykogenových konjugátů v buňkách. Výsledky konfokální mikroskopie ukázaly, že hodnoty Pearsonova koeficientu pro Dyomics 615 (navázaného na glykogenovém konjugátu) v kombinaci s Hoechst 33342 (barva pro jádra buněk) byly pod 0.2, což ukazuje na to, že kolokalizace těchto dvou fluorescečních barev je minimální a pouze náhodná. Z tohoto výsledku vyplývá, že modifikovaný glykogen po endocytóze do cytoplazmy není dále endocytován do jádra buňky. Tyto výsledky jsou plně v souladu s našimi předchozími studii (Filippov et al., 2012).

Nativní glykogen může být degradován dvěma způsoby. Prvním je fyziologická degradace pomocí enzymů specifických pro glykogen. Druhým méně častým způsobem je pak degradace v lysozómech pomocí  $\alpha$ -glykosidázy (Lloyd and Mason, 1996). Protože za normální situace není glykogen přítomen extracelulárně, snažili jsme se rozlišit, která ze dvou degradačních cest je preferenčně využívána pro naše konjugáty. Výsledky z kolokalizačních studií pomocí konfokální mikroskopie ukazují, že pro degradaci našich glykogenových konjugátů je nejpravděpodobněji využívána fyziologická cesta degradace skrze specifické enzymy pro rozklad endogenního glykogenu. Tento výsledek, tedy preferenční využití degradace pomocí specifických enzymů, podporuje naši hypotézu, že s glykogenovými konjugáty je v buňce zacházeno jako s nativním endogenním glykogenem, což by dále mohlo podporovat zamýšlené využití v diagnostice a pro konstrukci drug delivery systémů. Nicméně můžeme předpokládat, že u všech glykogenových konjugátů do jisté míry probíhá i degradace v lysozómech. Nižší Pearsonův koeficient pro GG-PMeOx-1-FITC ve srovnání s GG-GdDOTA-Dy615 (GG-PMeOx-1-FITC 0.1-0.18; GdDOTA-Dy615 bez přidané D-glukózy 0.3-0.45) může být vysvětlen, mimo jiné, i na pH závislé výši signálu fluorescenční barvy FITC.

Je známo, že glykogen v jaterních buňkách, bez přítomnosti D-glukózy, by měl být volně distribuován v cytoplazmě, neměl by se více hromadit v blízkosti

cytoplazmatické membrány ani by neměl být přítomen v jádru buněk. Ukládání glykogenu do blízkosti cytoplazmatické membrány probíhá až v přítomnosti D-glukózy (Fernández-Novell et al., 1997; García-Rocha et al., 2001; Ros et al., 2009). Toto je plně v souladu s výsledky našich experimentů, při kterých jsme inkubovali HepG2 buňky v médiu bez zvýšeného přídatku glukózy. Přítomnost klastrů s vyšší intenzitou fluorescence v cytoplazmě lze nejpravděpodobněji vysvětlit asociací fluorescenčně značených glykogenových konjugátů se specifickými enzymy, tyto asociace jsou známe pod pojmem glykozómy (Rybicka, 1996). Nicméně jsme nezaznamenali žádné rozdíly mezi inkubací HepG2 buněk s glykogenovými konjugáty a vyšším přídatkem D-glukózy v porovnání s inkubací za stejných podmínek pouze bez zvýšeného přídatku D-glukózy. Tento rozdíl oproti publikovaným datům může být vysvětlen tím, že námi přidáný glykogen je už plně formovaná molekula, která na sebe dále neváže D-glukózu, tudíž nejspíš ani nemění svoji lokalizaci v cytoplazmě po přídatku D-glukózy do média. Za fyziologických podmínek je glykogen syntetizován pomocí glykogen syntázy (v případě HepG2 buněk specificky pomocí jaterní glykogen syntázy) z jednotlivých molekul glukózy. Pokud jsou buňky v prostředí s vysokou koncentrací glukózy, jaterní glykogen syntáza je transportována do blízkosti cytoplazmatické membrány (Fernández-Novell et al., 1997) a z extracelulárních glukóz je glykogen syntetizován směrem od cytoplazmatické membrány k centru buňky (Fernández-Novell et al., 2002). Translokace jaterní glykogen syntázy a změny v syntéze glykogenu tak pravděpodobně neovlivňují ukládání již plně nasyntetizované molekuly modifikovaného glykogenu.

Mimo degradaci a lokalizaci glykogenových konjugátů jsme sledovali i mechanismy jejich pohlcování buňkou. MBCD slouží jako inhibitor kaveolinem zprostředkované endocytózy. Průměr fluorescenčního signálu z buněk byl nižší, pokud byly inkubovány s glykogenovými konjugáty a zároveň i s MBCD, a proto můžeme předpokládat, že MBCD inhibovala endocytózu glykogenových konjugátů. Endocytóza glykogenových konjugátů je tedy nejspíše zprostředkovaná pomocí kaveolinu. Tyto výsledky jsou v souladu s poznatky jiných studií, které zkoumaly endocytózu různých dendrimerů (mezi dendrimerní struktury se řadí i glykogenové konjugáty). Tyto studie prokázaly, že kaveolinem zprostředkovaná endocytóza je preferovaná ve většině jimi zkoumaných případů (Rewatkar et al., 2015). Nicméně v našem případě MBCD zainhiboval endocytózu glykogenových konjugátů pouze částečně, to by dále mohlo naznačovat, že pro endocytózu glykogenových konjugátů jsou využívány i jiné, více komplexní, způsoby vstupu do buněk.

Fluorescenční barva či MR kontrastní látka jsou vždy stabilně kovalentně navázány na největší vyprodukovaný fragment, v případě POX modifikovaných glykogenových konjugátů je to POX. Glykogenové konjugáty se tedy rozpadají na výše zmíněné fragmenty a dále na jednotlivé molekuly D-glukózy, které jsou následně metabolizovány. Nejpravděpodobnějším scénářem tedy je, že celá molekula glykogenového konjugátu je pohlcena pomocí endocytózy zprostředkované caveolinem a následně je glykogen degradován pomocí specifických enzymů na fragmenty s FL/MR značkami a jednotlivé molekuly D-glukózy. Fragmenty s FL/MR značkami dosahují rozměrů v řádech desítek nanometrů, tyto fragmenty jsou z buněk běžně exocytovány v řádech desítek minut až několika hodin (Oh and Park, 2014).

Výsledky z testu MTT zcela podporují naši hypotézu, že testované glykogenové konjugáty jsou netoxické, protože glykogen je přítomen skoro ve všech živých organismech a námi využitá modifikace svoji biokompatibilitu již prokázaly dříve. Nesignifikantně nižší hodnoty absorbance u vyšších koncentrací GG-GdDOTA-Dy615 jsou nejpravděpodobněji způsobené vlivem gadolinia ( $Gd^{3+}$ ), které může být při odštěpení z glykogenového konjugátu toxické. Toxicita  $Gd^{3+}$  byla prokázána již v mnoha studiích (Biagi and Enyeart, 1990; Lansman, 1990; Yongmin et al., 2013; Zhou and Lu, 2013). Nicméně cheláty  $Gd^{3+}$  jsou schválené pro klinické použití a vysoké koncentrace, které byly použity v námi provedené studii, nejsou běžně používány pro *in vivo* testování. Také jsme pomocí testu MTT potvrdili netoxický charakter samotného glykogenu, který byl použit pro syntézu konjugátů. Tudíž můžeme prohlásit, že jakákoli toxicita je způsobena modifikacemi, a nikoli samotným externě aplikovaným glykogenem. Modifikace pak mohou být libovolně měněny a optimálně nadefinovány tak, aby jednak vykazovaly, co nejnižší toxicitu a zároveň, co nejvyšší benefiční vlastnosti (míru kontrastu, clearance atd.) pro budoucí klinické využití modifikovaných glykogenových polymerů.

Eliminace GG-GdDOTA-Dy615 *in vivo* přes ledviny, kterou jsme v naší studii pozorovali v řádech několika hodin, plně koreluje s předchozími výsledky získanými z MRI (Filippov et al., 2012). Prvotní pokles (dvě hodiny po podání GG-GdDOTA-Dy615) fluorescenčního signálu lze vysvětlit tím, že v tento časový okamžik nebyl GG-GdDOTA-Dy615 již pouze v povrchových cévách a místě aplikace, jako tomu bylo ihned po podání, ale i v hlubších strukturách, nicméně ještě ne plně koncentrovaný v ledvinách a játrech. Zvýšení fluorescenčního signálu v ledvinách 24 hodin po aplikaci GG-GdDOTA-Dy615 ukazuje, že byl GG-GdDOTA-Dy615 v organismu degradován,

protože velikost celého modifikovaného glykogenu překračuje práh pro renální filtraci. Můžeme tedy předpokládat, že jsme v ledvinách detekovali v tomto časovém bodě pouze fluorescenční marker (Dyomics 615). Fluorescenční signál ze sleziny byl velice nízký, lze tedy konstatovat, že glykogenový konjugát nebyl ve velké míře pohlcován retikuloendotelovým systémem.

V druhé fázi testování glykogenových konjugátů jsme se více zaměřili na *in vivo* testování v nádorovém modelu a jejich potenciaální využití jakožto nosičů léčiv do nádorů. Také jsme již pracovali pouze s dvěma typy glykogenových konjugátů – GG-GdDOTA-IR800 (GG skupina) a GG-GdDOTA-PMeOx-IR800 (GOX skupina). Fluorescenční barva IR800CW byla zvolena kvůli vhodnosti pro *in vivo* fluorescenční zobrazování, její emisní maximum je totiž v infračerveném spektru při 794 nm. Tyto vlnové délky jsou méně zeslabovány při průchodu tkáněmi.

Nejdříve jsme ověřili senzitivitu vizualizace glykogenových konjugátů pomocí MR a FL metod, otestovány byly oba typy konjugátů v několika různých koncentracích. MRI, MR relaxometrie a fluorescenční měření potvrdilo dostatečnou senzitivitu pro modifikované glykogenové konjugáty. Dokonce i pro nejnižší testované koncentrace (0.06 mM  $Gd^{3+}$ ) byl signál na MR jednoznačně definovatelný. Vysoká míra MR relaxivity, dobrý kontrast na  $T_1$ -vážených MR snímcích a silný fluorescenční signál umožňují tyto glykogenové nanočástice sledovat pomocí multimodálního zobrazování i *in vivo*. Modifikace pomocí POX pomáhá zlepšit *in vivo* cílení do nádoru, a to díky snížení rychlosti biodegradace a zvýšení času cirkulace v krvi. Nicméně při testování samotných konjugátů jsme zaznamenali u POX modifikovaného glykogenu nižší MR relaxivitu, což ve svém důsledku snižuje efektivitu zobrazování. Tento efekt může být způsoben omezenou dostupností molekul vody pro chelát  $Gd^{3+}$  nebo vyšší konformační mobilitou molekul  $Gd^{3+}$  na koncích POX řetězců ve srovnání s cheláty přímo připojenými do středu molekuly glykogenu.

Pro určení potenciálu glykogenových konjugátů pro dopravu léčiv jsme zkoumali jejich biodistribuci, akumulaci a clearance. Experimenty jsme prováděli na xenograftovém modelu hepatocelulárního karcinomu u RNU kmene potkanů. Naše výsledky z multimodálního *in vivo* zobrazování jasně potvrzují akumulaci glykogenových konjugátů v nádorové tkáni, která vykazovala setrvalé zvýšení MR kontrastu. MR kontrast vycházející z glykogenových konjugátů byl vyšší než MR kontrast pozorovaný u kontrolní skupiny s GM, tento rozdíl lze vysvětlit akumulací glykogenových konjugátů v nádoru díky efektu EPR. Největší rozdíl mezi

glykogenovými konjugáty a kontrolním GM byl zaznamenán třetí den po *i.v.* aplikaci. Maximum akumulace bylo druhý den po aplikaci u skupiny s GG o koncentraci 0.04 mmol Gd<sup>3+</sup>/kg, což potvrzuje tento typ nosiče jakožto nejvhodnější pro cílené dopravení případných navázaných léčiv do nádoru. Je třeba zmínit, že nádory byly monitorovány pouze do dne sedm po *i.v.* aplikaci konjugátů. Sedmý den se obvykle rozvinula masivní nekróza nádorů, která byla potvrzena i histologicky. Nekróza v tumorech by pak při delším měření mohla ovlivnit validitu MR dat. Akumulace konjugátů v nádorech byla také potvrzena pomocí *in vivo* a *ex vivo* fluorescenčního měření. Pozorovali jsme rychlý pokles fluorescenčního signálu během prvních 24 hodin po aplikaci. Předchozí zvířecí studie využívající odlišné kontrastní MR a FL látky pozorovaly disociaci MR a fluorescenčního signálu, tedy podobný efekt, který byl nejspíše způsobený lysozomální degradací fluorescenčních barev (Bouvain et al., 2019; Gálisová et al., 2019).

Naše data z *in vivo* měření na MR ukazují, že glykogenové konjugáty s POX vykazují po celou dobu studie nižší míru signálu. Tento výsledek je nejspíše způsoben nižší MR relaxivitou POX modifikovaných glykogenových konjugátů (3.4x nižší ve srovnání s GG bez POX) než nižší mírou akumulace v nádorech. Tuto hypotézu potvrzuje i fakt, že hodnota fluorescenčního signálu z nádoru u GOX skupin nebyla signifikantně odlišná od hodnot fluorescenčního signálu z nádoru u GG skupin. Nicméně glykogenové konjugáty bez POX vykazovaly mírně vyšší *in vivo* i *ex vivo* signál, nejspíše v důsledku o něco vyšší akumulace.

Všechny cílené nosičové systémy léčiv musí minimalizovat toxický vliv navázaného léčiva tak, aby účinek na tkáň, které nejsou jejich cílem, byl minimální (Nussbaumer et al., 2011; Sikes, 2007). Z těchto důvodů je vhodné využívat modifikací, které se neváží na bílkoviny a celkově jsou méně nápadné pro imunitní systém, jako je například POX a PEO (Suk et al., 2016). Naše výsledky potvrzují, že POX, díky své menší nápadnosti pro imunitní systém, snižuje rychlost eliminace z těla a míru akumulace v játrech, slezině a ledvinách, pokud porovnááme GOX s GG. Pozorovali jsme signifikantně nižší MR a FL *in vivo* signál z ledvin a jater u GOX skupin ve srovnání s GG skupinami, a to po celou dobu studie. Tyto zjištění byly dále podpořeny výsledky fluorescenčního *ex vivo* měření vnitřních orgánů. Na základě našich pozorování a srovnání signálů z nádoru a vnitřních orgánů můžeme říct, že POX modifikace chrání orgány před akumulací kontrastní látky.

Výhody všech nosičů léčiv do značné míry závisí také na jejich schopnosti být po čase efektivně eliminovány z organismu. V naší studii obě použité zobrazovací

metody jak MRI, tak i FLI, ukázaly, že konjugáty byly eliminovány z pokusných zvířat především skrze ledviny, obdobně jako jsou preferenčně eliminovány cheláty pro MR, například i námi používaný DOTA. Jak jsme předpokládali, POX modifikace snížila ledvinovou clearance. MR signál z ledvin u zvířat s aplikovaným glykogenovým konjugátem bez POX zůstal zvýšený i sedmý den po injekci. Tato relativně dlouhá akumulace v ledvinách u konjugátu bez POX zdůrazňuje význam POX modifikace pro biokompatibilitu konjugátů. Nicméně je potřeba zmínit, že použité koncentrace  $Gd^{3+}$  v konjugátech (0.04 mmol  $Gd^{3+}/kg$ ), které by mohlo mít potencionálně vliv na míru biokompatibility, dosahovaly mnohem nižších hodnot než rutinně používané koncentrace v klinické praxi (0.1 mmol  $Gd^{3+}/kg$ ) (Lin and Brown, 2007). Proto předpokládáme, že nežádoucí vedlejší účinek  $Gd^{3+}$  byl zcela zanedbatelný. Což nám potvrdily i výsledky histologie a biochemie, kde nebyly nalezeny žádné patologické změny orgánů či měřených hodnot v krvi. Pokud bereme v potaz to, že naše glykogenové konjugáty byly endocytovány do buněk a tam rozloženy na jednotky D-glukózy (Jirátová et al., 2018), myslíme si, že se dále v nádorové tkáni degradovaly až na vodu a oxid uhličitý. Předpokládáme, že po degradaci glykogenu zbylý chelát (DOTA) a fluorescenční marker (IR800CW) bude z organismu odstraněn přes játra a ledviny, podobně jako se děje u klinicky schválených kontrastních MR látek založených na  $Gd^{3+}$ . Nicméně, tyto klinicky využívané konjugáty mohou nést další zobrazovací skupiny, jako jsou sondy MR  $^{19}F$ , což může také hrát určitou roli.

Nejdůležitějším faktorem při designu molekuly určené pro využití v cíleném dopravování léčiv je míra její toxicity. Naše biochemické analýzy potvrdily biokompatibilitu a netoxický charakter glykogenových konjugátů. Při testech cytotoxicity vykazovaly buňky inkubované s GG i GOX vykazovaly podobnou úroveň viability a proliferace jako kontrolní buňky. Stejně tak nebyly zaznamenány výrazné změny v biochemických parametrech séra odebraného v různých časových bodech po aplikaci glykogenových konjugátů. Další potvrzení netoxického charakteru glykogenových konjugátů přinesla i histologická analýza vnitřních orgánů (jater, ledvin, sleziny), kde nebyly nalezeny žádné patologické změny po administraci konjugátů.

Celkově tedy můžeme konstatovat, že hlavní výhodou našeho potencionálního nosiče léčiv založeného na glykogenu je možnost ho specificky upravit tak, aby léčivo bylo uvolněno na specifické cílovém místě za specifických podmínek, například při změna pH v místě nádoru (Kato et al., 2013). Tím pak poskytuje efektivní, specifický a bezpečný protinádorový efekt u různých typů nádorů.

## 7.2 Mananové konjugáty

Obdobně jako u glykogenových konjugátů i u mananových konjugátů jsme začali charakterizací *in vitro* vlastností. Výsledky z testu viability potvrdily u mananových konjugátů potenciál pro využití v biomedicině. Konkrétně i pro zamýšlené využití jakožto drug delivery systémů cílených na imunitní a metastatické buňky a se zvýšenou specifickou akumulací v lymfatických uzlinách, zvláště pak v SLN.

Po testu viability následovalo testování relaxivity fantomů, vyšší  $r_1$  a  $r_2$  relaxivity mananových konjugátů ve srovnání s GM lze vysvětlit sníženou mobilitou chelatovaného  $Gd^{3+}$ , která vyplývá z jeho konjugace na polymer o relativně vysoké molekulové hmotnosti. Snímání fantomů na fluorescenčním přístroji potvrdilo předpoklad, že FL signál mananových konjugátů se zvyšuje s vyšší koncentrací. GM měl vždy úroveň FL signálu na hladině signálu pozadí, což vzhledem k absenci fluorescenčního markeru na molekule GM očekávané.

Výsledky z *in vitro* testování mananových konjugátů nám potvrdili, že tyto polymerní konstrukty mají vlastnosti vhodné pro jejich zamýšlené využití, a proto jsme pokračovali pilotním *in vivo* testem na zdravých zvířatech.

V průběhu fluorescenčního měření jsme pozorovali nárůst FL signálu během prvních 24 hodin, po tomto časovém úseku již FL signál až do konce experimentu pouze klesal. Tento výsledek je možné vysvětlit tím, že ihned po *i.m.* aplikaci mananových konjugátů jsou tyto konjugáty, a tedy i navázaná fluorescenční barva, koncentrovány v relativně malém objemu místa aplikace a kvůli vysoké koncentraci v tomto místě se pak mohou jednotlivé fluorescenční molekuly vzájemně zhášet (Ghosh et al., 2013; Hamann et al., 2002; Swiecicki et al., 2016). Postupem času se mananové konjugáty s navázanou fluorescenční barvou distribuují do většího objemu a zhášení již má pouze zanedbatelný vliv na celkovou výši signálu. Výsledně je tedy více fotonů schopno projít srz tkáně a detekujeme vyšší signál. Fluorescenční *in vivo* měření také ukázalo, že POX graftování prodlužuje možnost zobrazování a zpomaluje biodegradaci mananového konjugátu s navázaným POX ve srovnání s mananovým konjugátem bez navázaného POX, což je plně v souladu s očekávaným efektem vlivu modifikace navázáním POX (Duncan et al., 2008; Hreczuk-Hirst et al., 2001).

Výsledky z MRI ukazují, že signál z místa aplikace konjugátů byl zřetelně a jednoznačně odlišný od signálu z neinjikovaného svalu, kde byl signál mnohem nižší. Ověření tohoto předpokladu pro nás bylo důležité vzhledem k budoucímu využití

mananových konjugátů. Také bylo zjištěno, že signál z lymfatických uzlin byl stabilně přítomen po celou dobu měření, což potvrzuje předpoklad akumulace mananových konjugátů v místě se zvýšenou koncentrací makrofágů a dendritických buněk, tedy buněk s DC-SIGN receptory, na které se manan váže tak, jak bylo již dříve prokázáno (Cui et al., 2003; Vu-Quang et al., 2012).

FL a MR signál z lymfatických uzlin výrazně v průběhu experimentu neklesal, nicméně totéž neplatilo o FL a MR signálu z orgánů (jater, ledvin a sleziny), kde FL i MR signál kontinuálně v čase klesal u obou typů mananových konjugátů. Tyto výsledky tedy naznačují, že jsou mananové konjugáty postupně degradovány a eliminovány z orgánů, respektive z organismu zvířete a zůstávají akumulovány pouze v místě cílení.

Celkově bylo v prvotních experimentech ověřeno, že stejně jako glykogenové konjugáty i mananové konjugáty mají lepší zobrazovací vlastnosti než GM, včetně jejich hodnot MR relaxivity a specifity fluorescenčního signálu. Také kontinuální akumulace mananových konjugátů s navázanými kontrastními látkami pro MRI a FLI potvrdila, že tyto konjugáty skutečně cílí na imunitní buňky, nejspíše skrze vazbu na DC-SIGN, jak již bylo popsáno i v literatuře (Cui et al., 2003; Vu-Quang et al., 2012).

V dalším procesu testování mananových konjugátů jsme byli více zaměřeni na *in vivo*, konkrétně na testování v klinicky více relevantním orthotopickém myším modelu nádoru mléčných žláz. 4T1 buňky byly zvoleny z důvodu, že tvoří metastázy, které se následně infiltrují do SLN, tak jak je běžné i u lidských nádorů prsu.

Druhá mananová studie byla více zaměřena *in vivo* směrem, nicméně, i přesto jsme začali *in vitro* testy. Konkrétně konfokální mikroskopie ukázala, že fluorescenční signál z MNOX je nižší ve srovnání s MN. Dále bylo zjištěno, že oba konjugáty, MNOX i MN, kolokalizují s lysozomy v podobném rozsahu. Nicméně Pearsonův koeficient pro kolokalizaci byl mírně nižší u MNOX, nejspíše kvůli nižšímu intracelulárnímu pohlcování. Z výsledků se zdá, že konjugát modifikovaný pomocí POX byl méně endocytován buňkami než konjugát bez POX. Tento fenomén může být způsoben částečně vlivem POX funkcionalizace, která může maskovat mananový konjugát, a tedy částečně blokovat aktivní vazbu s DC-SIGN receptory. Dále může POX funkcionalizace ovlivnit, respektive zpomalit, i samotnou rychlost endocytózy, jak bylo ukázáno i ve studiích, které se zaměřovali na obdobné typy funkcionalizace, jako například na dextrinovou sukcinilaci (Duncan et al., 2008; Hreczuk-Hirst et al., 2001) nebo modifikaci pomocí PEG (Suk et al., 2016)).



Výsledky z *in vivo* multimodálního zobrazování myši se syngenií orthotopickými nádory mléčných žláz byly ve shodě s *in vitro* poznatky. Obecně vyšší fluorescenční signál z jater a lymfatických uzlin u MN skupiny při měření fluorescence *in vivo* ukazuje na vyšší akumulaci mananového konjugátu bez POX. Toto je v souladu i s naším předpokladem založeným na výsledcích předchozích studií, které ukázali, že POX prodlužuje cirkulační čas polymerů v organismu, snižuje akumulaci v orgánech a dělá polymer méně nápadným pro imunitní systém (Duncan et al., 2008; Hreczuk-Hirst et al., 2001). Nižší akumulace v orgánech, jako jsou játra, ledviny a slezina, poskytuje konjugátu výhodu tím, že snižuje nežádoucí vedlejší účinky v orgánech, které nejsou konjugátem primárně cíleny. Na druhou stranu nevýhodou snížené akumulace je to, že akumulace POX modifikovaného konjugátu je snížena nejen v orgánech mimo primární cílení, ale i v nádoru a v cílených lymfatických uzlinách. Spolu s pasivním cílením pomocí efektu EPR, MN konjugát poskytuje lepší primární aktivní cílení než MNOX, a to zejména díky své vyšší afinitě k DC-SIGN receptorům. Je důležité zmínit, že DC-SIGN receptory jsou přítomny na makrofázích, zvláště pak těch, které se nacházejí v SLN, kde se nejčastěji vyskytují primární metastázy. Proto je vhodné aktivně cílit tyto místa s primárními metastázemi již v raném stádiu nádoru. Námi testované mananové konjugáty s navázaným POX mají zřejmě nižší dostupnost manózy pro vazbu s DC-SIGN receptory, a také mírně nižší obsah fluorescenční barvy IR800CW. Pro precizní vyvážení benefitů POX modifikace v manových konjugátech tak, aby byly maximalizovány benefity této modifikace, především nižší akumulace v orgánech, a zároveň zachována vysoká míra aktivního cílení do nádoru a lymfatických uzlin, je potřeba ještě dalších studií.

Přestože mananové konjugáty byly akumulovány hlavně v SLN, pozorovali jsme akumulaci i v jiných uzlinách. Míra a časový průběh akumulace ve vzdálenějších uzlinách od nádoru nám umožnila sledovat průběh šíření našich konjugátů lymfatickým systémem. MRI, které měřilo signál přímo ze SLN bez kontaminace signálem z místa injekce polymerů, potvrdilo preferenční akumulaci mananových konjugátů v lymfatických uzlinách, tato akumulace byla výrazně lepší než v případě kontrolní, komerčně dostupné kontrastní látky GM. Tyto výsledky z MRI jsou plně v souladu s výsledky z fluorescenčního měření.

Fluorescenční signál z orgánů (jater, ledvin a sleziny) měřený *ex vivo* klesal v čase, a to u obou typů mananových konjugátů. Tento trend ukazuje na postupnou degradaci a eliminaci těchto polymerních konstruktů. Degradace a eliminace, respektive

pokles signálu, byla pomalejší u MNOX, toto zjištění koresponduje s poznatky získanými i v jiných *in vivo* studiích s konjugáty založenými na přírodních polysacharidech (Duncan et al., 2008; Hreczuk-Hirst et al., 2001). Postupná degradace a eliminace je pak další z biologických vlastností, které potvrzují, že mananové konjugáty jsou vhodné pro zamýšlené klinické využití (Naahidi et al., 2017). Nicméně v naší studii byly i výjimky. Pokles fluorescence u MNOX skupiny nebyl v případě SLN, axilární lymfatické uzliny na nádorové straně a nádoru kontinuální. Fluorescenční signál u MN skupiny byl *in vivo* i *ex vivo* vždy vyšší se dvěma výjimkami, a to hodnotou fluorescenčního signálu z axilární lymfatické uzliny na nádorové straně v sedmý den po aplikaci a hodnotou fluorescenčního signálu z nádoru v den tři. V těchto dvou případech by fluorescenční signál vyšší u MNOX skupiny. Tyto výsledky mohou být způsobeny vlivem modifikace pomocí POX, konkrétně pomalejším buněčným pohlcováním, zpomalenou biodegradací a prodloužením cirkulačního času.

Doplnění komplexního obrazu o testovaných konjugátech poskytl i test MTT, který opět potvrdil biokompatibilitu a netoxický charakter mananových konjugátů. Výsledky byly v souladu s hypotézou, že mananové konjugáty jsou netoxické i při vyšších testovaných koncentracích. Histologická analýza vnitřních orgánů potvrdila předpoklad, že mananové konjugáty nemají nežadoucí vliv na tyto orgány. Jak bylo již dříve ukázáno,  $Gd^{3+}$  může mít negativní dopad na organismus, pokud je odštěpen z vazby (Lansman, 1990; Oh and Park, 2014; Yongmin et al., 2013; Zhou and Lu, 2013). Nicméně tento potencionálně negativní efekt  $Gd^{3+}$  byl u mananových konjugátů vyloučen, protože  $Gd^{3+}$  byl navázán na konjugáty v podobě v chelátového komplexu. Cheláty  $Gd^{3+}$  jsou také schválené pro klinické použití a rutinně používány, což by mohlo podpořit snadné začlenění našich mananových polymerů do budoucí klinické praxe.

Polymery na bázi mananu tedy mohou sloužit k diagnostice SLN. V budoucnu by mohly být, stejně jako glykogenové konjugáty, vylepšeny návazáním léčiva, které by se uvolnilo z vazby za specifických podmínek (jako například při změně pH), a stát se tedy bezpečným a specifickým drug delivery systémem.

## 8 Závěry

### **a) Obě platformy polysacharidových nosičů léčiv (glykogenové i mananové konjugáty) jsou netoxické a biokompatibilní**

Opakovaně bylo potvrzeno, že glykogenové i mananové konjugáty jsou netoxické, a tedy vhodné pro využití v biomedicíně. Testy byly provedeny *in vitro* i *in vivo*.

### **b) Obě platformy polysacharidových nosičů léčiv (glykogenové i mananové konjugáty) jsou vhodné pro multimodální zobrazování, které bylo úspěšně provedeno *in vitro* i *in vivo***

Prokázali jsme, že polysacharidové nosiče jsou vhodné pro multimodální zobrazování, jak pomocí MRI, tak i FLI. Obě metody se v základním a preklinickém výzkumu vhodně doplňují. Je také předpoklad, že versatility polysacharidových nosičů umožní navázání i případné jiné zobrazovací modality.

### **c) Mananové konjugáty prokázaly schopnost akumulace v SLNs díky cílení na DC-SIGN receptory**

Pomocí FLI a MRI jsme potvrdili předpoklad, že mananové konjugáty budou akumulované v SLN a jiných lymfatických uzlinách díky cílení na DC-SIGN receptory.

### **d) Funkcionalizace pomoxí POX snižuje akumulaci konjugátů v orgánech**

Nižší akumulace konjugátů modifikovaných pomocí POX odpovídá předpokladu, že modifikace polymetyloxazolinem snižuje rozpoznatelnost příslušného konjugátu. Ukázalo se, že množství navázaného POX ovlivňuje míru akumulace v orgánech.

## 9 Životopis autorky disertační práce

### Pracovní zkušenosti

#### **Roche**

*Produktový a marketingový manažer pro tkáňovou diagnostiku a onkologii, 2021 – nyní*

- Zajišťování odborných školení pro obchodní oddělení
- Přípravování materiálů pro zákazníky
- Překlady a kontrola globálních materiálů
- Komunikace se zákazníky a zajišťování jejich potřeb
- Studium produktového portfolia a histologie/patologie
- Optimalizace řešení pro laboratoře patologie
- Spolupráce na článcích do Labor Aktuell

#### **Sotio**

*Výzkumný pracovník preklinického oddělení, koordinátor preklinických studií, 2019 – 2021*

- Komunikace s komerčními výzkumnými organizacemi, zajišťování kontraktů a studií
- Design preklinických *in vivo* studií, kontrola protokolů ke studiím
- Analýza výsledků a následné psaní reportů
- Podpora obchodního, výrobního a klinického oddělení (příprava přehledů současných poznatků ohledně imuno-onkologie)
- Provádění a organizace laboratorních *in vitro* testů
- Spolupráce na odborných publikacích

#### **IKEM**

*Jiný odborný pracovník, 2012 – 2019*

- Testování nových nanočástic a drug delivery systémů pro nádorovou diagnostiku
- Kultivace buněčných linií, produkce nových GMO buněčných linií, fluorescenční mikroskopie, testování cytotoxicity, práce s pokusnými zvířaty (myši, potkani), optické *in vivo* zobrazování (fluorescence a luminiscence)
- Vedení studentského grantu UK (GAUK) – management malé výzkumné skupiny, plánování experimentů a práce, plánování a vedení rozpočtu, příprava publikací a výstupů na konferencích
- Příprava odborných článků

## Vzdělání

### **Doktorské studium**

2014 - nyní

- Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
- program Fyziologie živočichů
- disertační práce zpracovávána v IKEM ve spolupráci s ÚMCH AVČR
- zavedení několika metod (MTT test, indukce nádorů) na pracovišti
- hlavní řešitelka GAUK

### **Magisterské studium**

2012 - 2014

- Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
- program Fyziologie živočichů
- státní zkoušky z předmětů Molekulární fyziologie, Farmakologie/Toxikologie, Fyziologie, Buňky a tkáň *in vitro*
- jeden semestr ve Francii (Université de Poitiers) v rámci programu Erasmus
- téma diplomové práce: Metabolismus nových polysacharidických nanomateriálů pro biomedicínální aplikace

### **Bakalářské studium**

2009 - 2012

- Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
- program Biologie

## Odborné kongresy/konference/kurzy

- 45th CRS Annual Meeting 22-24/07/2018 • USA, New York • prezentace formou posteru
- 44th CRS (Controlled Release Society) Annual Meeting 16-19/07/2017 • USA, Boston • prezentace formou posteru
- 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research 09 - 12/07/2016 • UK, Manchester • prezentace formou posteru
- RECOOP 2015 Annual Project Review, 6th TriNet Meeting 15-18/10/2015 • Praha • prezentace formou posteru a přednáška
- European Cancer Congress 25-29/09/2015 • Rakousko, Vídeň • prezentace formou posteru
- Mikroskopické metody v biomedicíně 12-16/10/2015 • kurz organizovaný ČSMS (Česká a Slovenská mikroskopická společnost) a ÚMG AVČR
- Mezinárodní workshop „Magnetic Resonance Studies“ 21-23/05/2015 • Rakousko, Semmering • přednáška
- 19. setkání MR sekce 17-19/03/2015 • organizátoři: MR sekce RS ČLS JEP a Radiologická klinika LF MU a FN Brno-Bohunice

- Kurz odborné přípravy k získání kvalifikace a odborné způsobilosti na úseku pokusných zvířat dle §15d odstavce 2 písmeno a) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění 12/2014
- Šobrův den 11/06/2014 • XXVIII. Konference o hyperlipoproteinemii • organizováno Centrem preventivní kardiologie 3. interní kliniky VFN v Praze a Českou společností pro aterosklerózu
- Šobrův den 12/06/2013 • XXVII. Konference o hyperlipoproteinemii • organizováno Centrem preventivní kardiologie 3. interní kliniky VFN v Praze a Českou společností pro aterosklerózu
- Inovace Phd. Studia pro biotechnologické aplikace 27 - 31/05/2013 • workshop: Transportní mechanismy a povaha transportních mechanismů • organizátor: Contipro Biotech
- Škola molekulárních biotechnologií – nanotechnologie pro medicínu 20 - 24/05/2013 • workshop: Nosičové systémy pro biologicky aktivní materiály • organizátor: Contipro Biotech a VUT v Brně

## 10 Reference

- 4T1 ATCC ® CRL-2539<sup>TM</sup> [WWW Document], 2020. URL [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx?geo_country=cz) (accessed 5.3.21).
- Azzam, T., Eliyahu, H., Shapira, L., Linial, M., Barenholz, Y., Domb, A.J., 2002. Polysaccharide-oligoamine based conjugates for gene delivery. *J. Med. Chem.* 45, 1817–1824. <https://doi.org/10.1021/jm0105528>
- Barar, J., Omid, Y., 2013. Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. *BioImpacts BI* 3, 149–162. <https://doi.org/10.5681/bi.2013.036>
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y.M., Mendelsohn, J., 1998. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 58, 2825–2831.
- Basu, A., Kunduru, K.R., Abtey, E., Domb, A.J., 2015. Polysaccharide-Based Conjugates for Biomedical Applications. *Bioconjug. Chem.* 26, 1396–1412. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00242>
- Bazak, R., Houry, M., El Achy, S., Kamel, S., Refaat, T., 2015. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 769–784. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1767-3>
- Bernard, C., 1857. Remarques sur la formation de la matière glycogène du foie. - Bernard Claude Remarq. *Sur Form. Matière Glycogène Foie* - - - 44, 578–586.
- Bernard, C., 1855. Sur le mécanisme de la formation du sucre dans le foie. *undefined* 461–469.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., Farokhzad, O.C., 2014. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Biagi, B.A., Enyeart, J.J., 1990. Gadolinium blocks low- and high-threshold calcium currents in pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 259, C515-520. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1990.259.3.C515>
- Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 33, 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J., 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527–530. <https://doi.org/10.1038/301527a0>
- Bouvain, P., Flocke, V., Krämer, W., Schubert, R., Schrader, J., Flögel, U., Temme, S., 2019. Dissociation of <sup>19</sup>F and fluorescence signal upon cellular uptake of dual-contrast perfluorocarbon nanoemulsions. *Magma N. Y. N* 32, 133–145. <https://doi.org/10.1007/s10334-018-0723-7>
- Brown, K., Buchmann, A., Balmain, A., 1990. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 538–542. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.2.538>
- Buckeridge, M.S., 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol.* 154, 1017–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>
- Burke, B.P., Cawthorne, C., Archibald, S.J., 2017. Multimodal nanoparticle imaging agents: design and applications. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 375, 20170261. <https://doi.org/10.1098/rsta.2017.0261>
- Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N., Kataoka, K., 2011. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* 6, 815–823. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
- Cheng, L., Yang, K., Li, Y., Zeng, X., Shao, M., Lee, S.-T., Liu, Z., 2012. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials* 33, 2215–2222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.069>
- Cheong, W., Prahl, S., Welch, A., 1990. A review of the optical properties of biological tissues. <https://doi.org/10.1109/3.64354>
- Choi, J.Y., Ramasamy, T., Tran, T.H., Ku, S.K., Shin, B.S., Choi, H.-G., Yong, C.S., Kim, J.O., 2014. Systemic delivery of axitinib with nanohybrid liposomal nanoparticles inhibits hypoxic tumor growth. *J. Mater. Chem. B* 3, 408–416. <https://doi.org/10.1039/C4TB01442A>
- Clemons, T.D., Singh, R., Sorolla, A., Chaudhari, N., Hubbard, A., Iyer, K.S., 2018. Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their



- Overall Therapeutic Efficacy. *Langmuir* 34, 15343–15349.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02946>
- Coleman, C., Mitchell, J., Camphausen, K., 2002. Tumor Hypoxia: Chicken, Egg, or a Piece of the Farm? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20, 610–5.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.610>
- Cui, Z., Hsu, C.-H., Mumper, R.J., 2003. Physical Characterization and Macrophage Cell Uptake of Mannan-Coated Nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, 689–700.  
<https://doi.org/10.1081/DDC-120021318>
- Day, C.M., Hickey, S.M., Song, Y., Plush, S.E., Garg, S., 2020. Novel Tamoxifen Nanoformulations for Improving Breast Cancer Treatment: Old Wine in New Bottles. *Molecules* 25, 1182. <https://doi.org/10.3390/molecules25051182>
- De La Rochere, P., Guil-Luna, S., Decaudin, D., Azar, G., Sidhu, S.S., Piaggio, E., 2018. Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology. *Trends Immunol.* 39, 748–763. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.07.001>
- Dong, Y., Feng, Q., Yang, W., Lu, Z., Deng, C., Zhang, L., Lian, Z., Liu, J., Luo, X., Pei, S., Mo, X., Huang, W., Liang, C., Zhang, B., Zhang, S., 2018. Preoperative prediction of sentinel lymph node metastasis in breast cancer based on radiomics of T2-weighted fat-suppression and diffusion-weighted MRI. *Eur. Radiol.* 28, 582–591. <https://doi.org/10.1007/s00330-017-5005-7>
- Double, J.A., Ball, C.R., Cowen, P.N., 1975. Transplantation of adenocarcinomas of the colon in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 271–275.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/54.1.271>
- Duncan, R., Gilbert, H.R.P., Carbajo, R.J., Vicent, M.J., 2008. Polymer Masked–Unmasked Protein Therapy. 1. Bioresponsive Dextrin–Trypsin and –Melanocyte Stimulating Hormone Conjugates Designed for  $\alpha$ -Amylase Activation. *Biomacromolecules* 9, 1146–1154.  
<https://doi.org/10.1021/bm701073n>
- Dyba, T., Randi, G., Bray, F., Martos, C., Giusti, F., Nicholson, N., Gavin, A., Flego, M., Neamtii, L., Dimitrova, N., Negrão Carvalho, R., Ferlay, J., Bettio, M., 2021. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 157, 308–347.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.07.039>
- Edelman, R.R., Warach, S., 1993. Magnetic Resonance Imaging. *N. Engl. J. Med.* 328, 708–716. <https://doi.org/10.1056/NEJM199303113281008>

- Edwards, M., Scott, C., Gidley, M.J., Reid, J.S., 1992. Control of mannose/galactose ratio during galactomannan formation in developing legume seeds. *Planta* 187, 67–74. <https://doi.org/10.1007/BF00201625>
- Evertsson, M., Kjellman, P., Cinthio, M., Andersson, R., Tran, T.A., in't Zandt, R., Grafström, G., Toftevall, H., Fredriksson, S., Ingvar, C., Strand, S.-E., Jansson, T., 2017. Combined Magnetomotive ultrasound, PET/CT, and MR imaging of <sup>68</sup>Ga-labelled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in rat sentinel lymph nodes in vivo. *Sci. Rep.* 7, 4824. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04396-z>
- Ezekowitz, R.A., Williams, D.J., Koziel, H., Armstrong, M.Y., Warner, A., Richards, F.F., Rose, R.M., 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351, 155–158. <https://doi.org/10.1038/351155a0>
- Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., 2011. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, EPR Effect Based Drug Design and Clinical Outlook for Enhanced Cancer Chemotherapy 63, 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- Faraji, A.H., Wipf, P., 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2950–2962. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.043>
- Feinberg, H., Castelli, R., Drickamer, K., Seeberger, P.H., Weis, W.I., 2007. Multiple Modes of Binding Enhance the Affinity of DC-SIGN for High Mannose N-Linked Glycans Found on Viral Glycoproteins \*. *J. Biol. Chem.* 282, 4202–4209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609689200>
- Feinberg, H., Mitchell, D.A., Drickamer, K., Weis, W.I., 2001. Structural Basis for Selective Recognition of Oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294, 2163–2166. <https://doi.org/10.1126/science.1066371>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fernández-Novell, J.M., Bellido, D., Vilaró, S., Guinovart, J.J., 1997. Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 321, 227–231.

- Fernández-Novell, J.M., López-Iglesias, C., Ferrer, J.C., Guinovart, J.J., 2002. Zonal distribution of glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 531, 222–228. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03506-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03506-8)
- Ferreira, S.A., Coutinho, P.J.G., Gama, F.M., 2010. Self-Assembled Nanogel Made of Mannan: Synthesis and Characterization. *Langmuir* 26, 11413–11420. <https://doi.org/10.1021/la100903j>
- Filippov, S.K., Sedlacek, O., Bogomolova, A., Vetric, M., Jirak, D., Kovar, J., Kucka, J., Bals, S., Turner, S., Stepanek, P., Hruby, M., 2012. Glycogen as a Biodegradable Construction Nanomaterial for in vivo Use. *Macromol. Biosci.* 12, 1731–1738. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200294>
- Flanagan, S.P., 1966. “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* 8, 295–309. <https://doi.org/10.1017/s0016672300010168>
- Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., Williams, G., 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133, 275–288. <https://doi.org/10.1084/jem.133.2.275>
- Frangioni, J.V., 2008. New Technologies for Human Cancer Imaging. *J. Clin. Oncol.* 26, 4012–4021. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.3065>
- Frangioni, J.V., 2003. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 626–634. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.007>
- Freshney, R.I., 2011. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* John Wiley & Sons.
- Gaber, M., Medhat, W., Hany, M., Saher, N., Fang, J.-Y., Elzoghby, A., 2017. Protein-lipid nanohybrids as emerging platforms for drug and gene delivery: Challenges and outcomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 254, 75–91. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.392>
- Gálisová, A., Herynek, V., Swider, E., Sticová, E., Pátiková, A., Kosinová, L., Kříž, J., Hájek, M., Srinivas, M., Jirák, D., 2019. A Trimodal Imaging Platform for Tracking Viable Transplanted Pancreatic Islets In Vivo: F-19 MR, Fluorescence, and Bioluminescence Imaging. *Mol. Imaging Biol.* 21, 454–464. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1270-3>

- García-Rocha, M., Roca, A., De La Iglesia, N., Baba, O., Fernández-Novell, J.M., Ferrer, J.C., Guinovart, J.J., 2001. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 357, 17–24.
- Garcia-Vallejo, J.J., Kooyk, Y. van, 2013. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol.* 34, 482–486. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.03.001>
- Gheorghescu, A.K., Tywoniuk, B., Duess, J., Buchete, N.-V., Thompson, J., 2015. Exposure of chick embryos to cadmium changes the extra-embryonic vascular branching pattern and alters expression of VEGF-A and VEGF-R2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.004>
- Ghosh, M., Nath, S., Hajra, A., Sinha, S., 2013. Fluorescence self-quenching of tetraphenylporphyrin in liquid medium. *J. Lumin.* 141, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.03.025>
- Giannaccini, M., Cuschieri, A., Dente, L., Raffa, V., 2014. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10, 703–719. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.09.010>
- Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries - Sung - 2021 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [WWW Document], n.d. URL <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660> (accessed 1.22.22).
- Gonçalves, C., Ferreira, S.A., Correia, A.L., Lopes, C., Fleming, C.E., Rocha, E., Vilanova, M., Gama, M., 2016. Potential of mannan or dextrin nanogels as vaccine carrier/adjuvant systems. *J. Bioact. Compat. Polym.* 31, 453–466. <https://doi.org/10.1177/0883911516631354>
- Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K., 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 591–598. <https://doi.org/10.1038/nsmb784>
- Haley, P.J., 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology* 188, 49–71. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00043-x)
- Hamann, S., Kiilgaard, J.F., Litman, T., Alvarez-Leefmans, F.J., Winther, B.R., Zeuthen, T., 2002. Measurement of Cell Volume Changes by Fluorescence Self-Quenching. *J. Fluoresc.* 12, 139–145. <https://doi.org/10.1023/A:1016832027325>

- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hason, M., Bartůněk, P., 2019. Zebrafish Models of Cancer—New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes* 10, 935. <https://doi.org/10.3390/genes10110935>
- Höckel, M., Vaupel, P., 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266–276. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.266>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Lingley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M.,

- Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hreczuk-Hirst, D., Chicco, D., German, L., Duncan, R., 2001. Dextrins as potential carriers for drug targeting: tailored rates of dextrin degradation by introduction of pendant groups. *Int. J. Pharm.* 230, 57–66. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00859-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00859-6)
- Hrubý, M., Ku, J., Kozempel, J., 2006. CÍLENÉ POLYMERNÍ NOSIČE LÉČIV V TERAPII NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ. *Chem Listy* 7.
- Hu, J., Wei, P., Seeberger, P.H., Yin, J., 2018. Mannose-Functionalized Nanoscaffolds for Targeted Delivery in Biomedical Applications. *Chem. – Asian J.* 13, 3448–3459. <https://doi.org/10.1002/asia.201801088>
- Jackson, S.E., Chester, J.D., 2015. Personalised cancer medicine: Personalised Cancer Medicine. *Int. J. Cancer* 137, 262–266. <https://doi.org/10.1002/ijc.28940>
- Jagadeeshan, S., Sagayaraj, R.V., Paneerselvan, N., Ghouse, S.S., Malathi, R., 2017. Toxicity and anti-angiogenicity evaluation of Pak1 inhibitor IPA-3 using zebrafish embryo model. *Cell Biol. Toxicol.* 33, 41–56. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9358-5>
- Jain, R., Dandekar, P., Patravale, V., 2009. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. *J. Controlled Release* 138, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.010>
- Jiráková, M., Gálisová, A., Rabyk, M., Sticová, E., Hrubý, M., Jiráček, D., 2020. Mannan-Based Nanodiagnostic Agents for Targeting Sentinel Lymph Nodes and Tumors. *Molecules* 26, 146. <https://doi.org/10.3390/molecules26010146>
- Jiráková, M., Pospíšilová, A., Rabyk, M., Pařízek, M., Kovář, J., Gálisová, A., Hrubý, M., Jiráček, D., 2018. Biological characterization of a novel hybrid copolymer carrier system based on glycogen. *Drug Deliv. Transl. Res.* 8, 73–82. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0436-x>

- Jonkers, J., Derksen, P.W.B., 2007. Modeling Metastatic Breast Cancer in Mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 191–203. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9050-8>
- Joseph, F.J., van Oepen, A., Friebe, M., 2017. Breast sentinel lymph node biopsy with imaging towards minimally invasive surgery. *Biomed. Eng. Biomed. Tech.* 62, 547–555. <https://doi.org/10.1515/bmt-2016-0164>
- Jung, J., 2014. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicol. Res.* 30, 1–5. <https://doi.org/10.5487/TR.2014.30.1.001>
- Karaman, S., Detmar, M., 2014. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J. Clin. Invest.* 124, 922–928. <https://doi.org/10.1172/JCI71606>
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., Baba, Y., 2013. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int.* 13, 89. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89>
- Khanna, C., Hunter, K., 2005. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26, 513–523. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh261>
- Kim, J.O., Ramasamy, T., Yong, C.S., Nukolov, N.V., Bronich, T.K., Kabanov, A.V., 2013. Cross-linked Polymeric Micelles based on Block Ionomer Complexes. *Mendeleev Commun.* 23, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2013.07.001>
- Krischer, B., Forte, S., Niemann, T., Kubik-Huch, R.A., Leo, C., 2018. Feasibility of breast MRI after sentinel procedure for breast cancer with superparamagnetic tracers. *Eur. J. Surg. Oncol.* 44, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2017.11.016>
- Kucinska, M., Murias, M., Nowak-Sliwinska, P., 2017. Beyond mouse cancer models: Three-dimensional human-relevant in vitro and non-mammalian in vivo models for photodynamic therapy. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 773, 242–262. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.002>
- Kutlusoy, T., Oktay, B., Apohan, N.K., Süleymanoğlu, M., Kuruca, S.E., 2017. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 366–378. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.067>

- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R., Weinberg, R.A., 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168, 670–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- Lansman, J.B., 1990. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J. Gen. Physiol.* 95, 679–696. <https://doi.org/10.1085/jgp.95.4.679>
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., Dick, J.E., 1992. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255, 1137–1141. <https://doi.org/10.1126/science.1372131>
- Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J.H., Kim, K., Kwon, I.C., 2012. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev* 41, 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/C2CS15261D>
- Lepencies, B., Lee, J., Sonkaria, S., 2013. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Polysaccharide-based systems in drug and gene delivery 65, 1271–1281. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.007>
- Lepore, M., Portaccio, M., La Gatta, A., D’Agostino, A., Izzo, E., Schiraldi, C., Delfino, I., 2015. Preparation and characterization of 3D hyaluronic-acid-based scaffolds with controlled optical properties for biomedical applications. <https://doi.org/10.1109/BioPhotonics.2015.7304049>
- Li, X., Kim, J., Yoon, J., Chen, X., 2017. Cancer-Associated, Stimuli-Driven, Turn on Theranostics for Multimodality Imaging and Therapy. *Adv. Mater.* 29, 1606857. <https://doi.org/10.1002/adma.201606857>
- Lin, S.-P., Brown, J.J., 2007. MR contrast agents: physical and pharmacologic basics. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 25, 884–899. <https://doi.org/10.1002/jmri.20955>
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z., 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1650–1662. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>
- Lloyd, J.B., Mason, R.W., 1996. *Biology of the Lysosome*. Springer Science & Business Media.
- Louie, A., 2010. Multimodality Imaging Probes: Design and Challenges. *Chem. Rev.* 110, 3146–3195. <https://doi.org/10.1021/cr9003538>



- Lu, B., Wang, H., Lu, Q., Tang, Z., Dou, H., Dai, T., Li, S., 2019. Novel Hybrid Dextran-Gadolinium Nanoparticles as High-relaxivity T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Mapping the Sentinel Lymph Node: *J. Comput. Assist. Tomogr.* 43, 350–357. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000842>
- Luan, J., Wu, K., Li, C., Liu, J., Ni, X., Xiao, M., Xu, Y., Kuang, Y., Jiang, F., 2017. pH-Sensitive drug delivery system based on hydrophobic modified konjac glucomannan. *Carbohydr. Polym.* 171, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.094>
- Lyman, G.H., Temin, S., Edge, S.B., Newman, L.A., Turner, R.R., Weaver, D.L., Benson, A.B., Bosserman, L.D., Burstein, H.J., Cody, H., Hayman, J., Perkins, C.L., Podoloff, D.A., Giuliano, A.E., 2014. Sentinel Lymph Node Biopsy for Patients With Early-Stage Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* 32, 1365–1383. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1177>
- Majee, S.B., Avlani, D., Biswas, G.R., 2017. Pharmacological, pharmaceutical, cosmetic and diagnostic applications of sulfated polysaccharides from marine algae and bacteria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 11, 68–77. <https://doi.org/10.5897/AJPP2016.4695>
- Mak, I.W., Evaniew, N., Ghert, M., 2014. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* 6, 114–118.
- Matsui, M., Kakut, M., Misaki, A., 1996. Fine structural features of oyster glycogen: mode of multiple branching. *Carbohydr. Polym.* 31, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00116-6)
- Matsumura, Y., Maeda, H., 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387–6392.
- Ménová, P., 2021. ASGPR A DC-SIGN: C-LEKTINOVÉ RECEPTORY SE SLIBNÝM POTENCIÁLEM V MEDICINÁLNÍ CHEMII. *Chem Listy* 8.
- Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 165–178. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1423-4>
- Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., Wilson, D.B., 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256–259. <https://doi.org/10.1038/335256a0>

- Muntimadugu, E., Ickowicz, D.E., Domb, A.J., Khan, W., 2013. Polysaccharide Biomaterials. *Isr. J. Chem.* 53, 787–794. <https://doi.org/10.1002/ijch.201300062>
- Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P., 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* 35, 530–544. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>
- Nagai, H., Kim, Y.H., 2017. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J. Thorac. Dis.* 9, 448–451. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.02.75>
- Nussbaumer, S., Bonnabry, P., Veuthey, J.-L., Fleury-Souverain, S., 2011. Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta* 85, 2265–2289. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R.J., Ketchum, P.A., Finkelman, M.A., Rex, J.H., Ostrosky-Zeichner, L., 2004. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 39, 199–205. <https://doi.org/10.1086/421944>
- Oh, N., Park, J.-H., 2014. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomedicine* 9, 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- Omidi, Y., Barar, J., 2014. Targeting tumor microenvironment: crossing tumor interstitial fluid by multifunctional nanomedicines. *BioImpacts BI* 4, 55–67. <https://doi.org/10.5681/bi.2014.021>
- Pan, S., Brentnall, T.A., Chen, R., 2016. Glycoproteins and glycoproteomics in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 9288–9299. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i42.9288>
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G., 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Pautler, R.G., 2004. Mouse MRI: concepts and applications in physiology. *Physiol. Bethesda Md* 19, 168–175. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2004>
- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A., 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J.*

- Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV 93, 52–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>
- Pospisilova, A., Filippov, S.K., Bogomolova, A., Turner, S., Sedlacek, O., Matushkin, N., Cernochova, Z., Stepanek, P., Hruby, M., 2014. Glycogen-graft-poly(2-alkyl-2-oxazolines) – the new versatile biopolymer-based thermoresponsive macromolecular toolbox. *RSC Adv.* 4, 61580–61588.  
<https://doi.org/10.1039/C4RA10315G>
- Putaux, J.-L., Buléon, A., Borsali, R., Chanzy, H., 1999. Ultrastructural aspects of phytoglycogen from cryo-transmission electron microscopy and quasi-elastic light scattering data. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 145–150.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00076-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00076-8)
- Rabyk, M., Galisova, A., Jiratova, M., Patsula, V., Srbova, L., Loukotova, L., Parnica, J., Jirak, D., Stepanek, P., Hruby, M., 2018. Mannan-based conjugates as a multimodal imaging platform for lymph nodes. *J. Mater. Chem. B* 6, 2584–2596.  
<https://doi.org/10.1039/C7TB02888A>
- Ramasamy, T., Haidar, Z.S., Tran, T.H., Choi, J.Y., Jeong, J.-H., Shin, B.S., Choi, H.-G., Yong, C.S., Kim, J.O., 2014. Layer-by-layer assembly of liposomal nanoparticles with PEGylated polyelectrolytes enhances systemic delivery of multiple anticancer drugs. *Acta Biomater.* 10, 5116–5127.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.021>
- Rao, J., Dragulescu-Andrasi, A., Yao, H., 2007. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr. Opin. Biotechnol., Analytical biotechnology* 18, 17–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.003>
- Rewatkar, P.V., Parton, R.G., Parekh, H.S., Parat, M.-O., 2015. Are caveolae a cellular entry route for non-viral therapeutic delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev., Editor's Collection 2015* 91, 92–108. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.003>
- Richmond, A., Su, Y., 2008. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis. Model. Mech.* 1, 78–82. <https://doi.org/10.1242/dmm.000976>
- Ros, S., García-Rocha, M., Domínguez, J., Ferrer, J.C., Guinovart, J.J., 2009. Control of Liver Glycogen Synthase Activity and Intracellular Distribution by Phosphorylation \*. *J. Biol. Chem.* 284, 6370–6378.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808576200>
- Rybicka, K.K., 1996. Glycosomes — the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28, 253–265. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(96\)80013-9](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(96)80013-9)

- Ryu, J.H., Lee, S., Son, S., Kim, S.H., Leary, J.F., Choi, K., Kwon, I.C., 2014. Theranostic nanoparticles for future personalized medicine. *J. Controlled Release* 190, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.027>
- Sanderson, M.J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M.D., 2014. *Fluorescence Microscopy*. Cold Spring Harb. Protoc. 2014, pdb.top071795-pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Sarparanta, M., Pourat, J., Carnazza, K.E., Tang, J., Paknejad, N., Reiner, T., Kostianen, M.A., Lewis, J.S., 2020. Multimodality labeling strategies for the investigation of nanocrystalline cellulose biodistribution in a mouse model of breast cancer. *Nucl. Med. Biol.* 80–81, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.11.002>
- Shapoval, O., Kaman, O., Hromádková, J., Vavřík, D., Jiráček, D., Machová, D., Parnica, J., Horák, D., 2019. Multimodal PSSMA-Functionalized GdF<sub>3</sub> : Eu<sup>3+</sup>(Tb<sup>3+</sup>) Nanoparticles for Luminescence Imaging, MRI, and X-Ray Computed Tomography. *ChemPlusChem* 84, 1135–1139. <https://doi.org/10.1002/cplu.201900352>
- Shelke, N.B., James, R., Laurencin, C.T., Kumbar, S.G., 2014. Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polym. Adv. Technol.* 25, 448–460. <https://doi.org/10.1002/pat.3266>
- Shi, J., Kantoff, P.W., Wooster, R., Farokhzad, O.C., 2017. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 17, 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shokrollahi, H., 2013. Contrast agents for MRI. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 4485–4497. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.012>
- Sikes, R.A., 2007. Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. *Br. J. Cancer* 97, 1713. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604075>
- Sindhwani, S., Syed, A.M., Ngai, J., Kingston, B.R., Maiorino, L., Rothschild, J., MacMillan, P., Zhang, Y., Rajesh, N.U., Hoang, T., Wu, J.L.Y., Wilhelm, S., Zilman, A., Gadde, S., Sulaiman, A., Ouyang, B., Lin, Z., Wang, L., Egeblad, M., Chan, W.C.W., 2020. The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nat. Mater.* 19, 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>
- Sree, S.V., Ng, E.Y.-K., Acharya U, R., Tan, W., 2010. Breast imaging systems: a review and comparative study. *J. Mech. Med. Biol.* 10, 5–34. <https://doi.org/10.1142/S0219519410003277>

- Suk, J.S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L.M., 2016. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Non-antigenic regulators of targeting for imaging and therapy 99, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Swiecicki, J.-M., Thiebaut, F., Di Pisa, M., Gourdin -Bertin, S., Tailhades, J., Mansuy, C., Burlina, F., Chwetzoff, S., Trugnan, G., Chassaing, G., Lavielle, S., 2016. How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides. *Sci. Rep.* 6, 20237. <https://doi.org/10.1038/srep20237>
- Takayama, S., 1968. Induction of Transplantable Liver Tumors in DBF1 Mice After Oral Administration of N,N'-2,7-Fluorenylenebisacetamide. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 40, 629–641. <https://doi.org/10.1093/jnci/40.3.629>
- Tang, C.K., Lodding, J., Minigo, G., Pouniotis, D.S., Plebanski, M., Scholzen, A., McKenzie, I.F.C., Pietersz, G.A., Apostolopoulos, V., 2007. Mannan-mediated gene delivery for cancer immunotherapy. *Immunology* 120, 325–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02506.x>
- Tang, L., Yang, X., Dobrucki, L.W., Chaudhury, I., Yin, Q., Yao, C., Lezmi, S., Helferich, W.G., Fan, T.M., Cheng, J., 2012. Aptamer-Functionalized, Ultra-Small, Monodisperse Silica Nanoconjugates for Targeted Dual-Modal Imaging of Lymph Nodes with Metastatic Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 12721–12726. <https://doi.org/10.1002/anie.201205271>
- Taurin, S., Nehoff, H., Greish, K., 2012. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *J. Controlled Release, The 12th edition of the European Symposium on Controlled Drug Delivery, (ESCDD2012) April 4-6, 2012, Egmond aan Zee, The Netherlands* 164, 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.013>
- The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide - Bray - 2021 - *Cancer* - Wiley Online Library [WWW Document], n.d. URL [https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.33587?casa\\_token=NXdBrLZOuccAAAAA%3ASWpq5AgPW5rASvk2b7dXbH3-0fGspi07o4vUwjaRloTCPmEERSxxmY1yNnK3ptvHmZwGhqHQllsRd9c](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.33587?casa_token=NXdBrLZOuccAAAAA%3ASWpq5AgPW5rASvk2b7dXbH3-0fGspi07o4vUwjaRloTCPmEERSxxmY1yNnK3ptvHmZwGhqHQllsRd9c) (accessed 1.22.22).

- Tirone, T.A., Brunicardi, F.C., 2001. Overview of Glucose Regulation. *World J. Surg.* 25, 461–467. <https://doi.org/10.1007/s002680020338>
- Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., Jemal, A., 2016. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25, 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L., Seymour, L., 2003. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 4227–4239.
- Vu-Quang, H., Muthiah, M., Kim, Y.-K., Cho, C.-S., Namgung, R., Kim, W.J., Rhee, J.H., Kang, S.H., Jun, S.Y., Choi, Y.-J., Jeong, Y.Y., Park, I.-K., 2012. Carboxylic mannan-coated iron oxide nanoparticles targeted to immune cells for lymph node-specific MRI in vivo. *Carbohydr. Polym.* 88, 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.067>
- Warburg, O., 1956a. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., 1956b. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Warburg report on the metabolism of tumors, 1930. . *J. Chem. Educ.* 7, 179. <https://doi.org/10.1021/ed007p179>
- Wege, A.K., 2018. Humanized Mouse Models for the Preclinical Assessment of Cancer Immunotherapy. *BioDrugs* 32, 245–266. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0275-4>
- Welch, D. R., 2006. Defining a cancer metastasis. *AACR education book 2006*.
- Welch, D.R., Hurst, D.R., 2019. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* 79, 3011–3027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- World Population Prospects: The 2017 Revision | Multimedia Library - United Nations Department of Economic and Social Affairs [WWW Document], 2017. URL <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html> (accessed 5.2.21).
- Xie, B.-W., Mol, I.M., Keereweer, S., van Beek, E.R., Que, I., Snoeks, T.J.A., Chan, A., Kaijzel, E.L., Löwik, C.W.G.M., 2012. Dual-Wavelength Imaging of Tumor Progression by Activatable and Targeting Near-Infrared Fluorescent Probes in a Bioluminescent Breast Cancer Model. *PLoS ONE* 7, e31875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031875>

- Yamabhai, M., Sak-Ubol, S., Srila, W., Haltrich, D., 2016. Mannan biotechnology: from biofuels to health. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 32–42. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923372>
- Yongmin, C., Gang, H.L., Tae-Jeong, K., Kwon-Seok, C., 2013. Toxicity of Magnetic Resonance Imaging Agents: Small Molecule and Nanoparticle. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 434–445.
- Zelmer, A., Ward, T.H., 2013. Noninvasive fluorescence imaging of small animals: NONINVASIVE FLUORESCENCE IMAGING. *J. Microsc.* 252, 8–15. <https://doi.org/10.1111/jmi.12063>
- Zeng, L., Li, W., Chen, C.-S., , 2020. Breast cancer animal models and applications. *Zool. Res.* 41, 477–494. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.095>
- Zhang, Y., Chan, H.F., Leong, K.W., 2013. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv. Drug Deliv. Rev., Advanced Drug Delivery: Perspectives and Prospects* 65, 104–120. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.003>
- Zhou, Z., Lu, Z.-R., 2013. Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* 5, 1–18. <https://doi.org/10.1002/wnan.1198>
- Zia, F., Zia, K.M., Zuber, M., Ahmad, H.B., Muneer, M., 2016. Glucomannan based polyurethanes: A critical short review of recent advances and future perspectives. *Int. J. Biol. Macromol.* 87, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.058>

## **11 Přílohy**