



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Stanovení potenciálních nádorových
markerů v tekutinách pomocí
funkcionalizovaných nanovláken**

**Detection of potential cancer markers in
liquids using functionalised nanofibers**

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Šárka Beková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Bruno Sopko, Ph.D.

Kladno 2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Beková** Jméno: **Šárka** Osobní číslo: **499605**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Stanovení potenciálních nádorových markerů v tekutinách pomocí funkcionalizovaných nanovláken

Název bakalářské práce anglicky:

Detection of potential cancer markers in liquids using functionalised nanofibers

Pokyny pro vypracování:

Předmětem BP je přispět k rozvoji aplikace funkcionalizovaných nanovláken v personalizované medicíně. Personalizovaná medicína patří nepochybně k nejperspektivnějším oblastem moderní medicíny a funkcionalizovaná nanovláknina budou v jejím rámci hrát klíčovou roli především v theragnostice a aplikaci ultrasensitivních bionanosensorů pro časnou detekci závažných onemocnění z tělních tekutin. Předmětem práce je identifikace a experimentální in vitro imobilizace proteinových markerů, charakteristických pro onkologická onemocnění v tělních tekutinách, což je zásadní krok pro vývoj specifických bionanosensorů vhodných pro časnou detekci závažných onemocnění. V rámci praktické části práce bude provedena instruktáž o výrobě a vlastnostech nanovláknenných nosičů, dále pomocí nanovláken funkcionalizovaných navázáním protilátky proti danému proteinu bude určena validita navázání. Experimentální data budou vyhodnocena pomocí vhodných statistických metod.

Seznam doporučené literatury:

- [1] VANACORE, Daniela, Mariarosaria BOCCELLINO, Sabrina ROSSETTI, et al., Micromas in prostate cancer: an overview, online, ed. 2017, Přístupné z: <https://doi.org/doi:10.18632/oncotarget.16933>, ISSN 1949-2553
- [2] HILLMAN, Yaron, Jenia GERSHBERG, Dan LUSTIGER, et al., Monoclonal Antibody-Based Biosensor for Point-of-Care Detection of Type III Secretion System Expressing Pathogens, online, Analytical Chemistry, ed. 2021, ročník 98, číslo 2, Přístupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03621>, ISSN1520-6882
- [3] Early Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Is a Stronger Independent Prognostic Factor for Stage II Colorectal Cancer Patients Than T4 Stage and Preoperative CEA, FENQI, Du, Liu YUPENG, Zhang QIUJU, et al., online, Frontiers in Oncology, ed. 2022, ročník 11, Přístupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.758509>, ISSN 2234-943X

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

RNDr. Bruno Sopko, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: **14.02.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2024**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Stanovení potenciálních nádorových markerů v tekutinách pomocí funkcionalizovaných nanovláken vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2023

.....
Šárka Beková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, konstruktivní připomínky a čas věnovaný této práci. Dále mé poděkování náleží RNDr. Brunovi Sopkovi, Ph.D. za odbornou pomoc a umožnění realizace praktické části v laboratoři. Za instruktáž při výrobě biokompatibilních nanovláken děkuji Ing. Anně Novotné z laboratoře pokročilých biomateriálů v Univerzitním centru energeticky efektivních budov.

ABSTRAKT

Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu nově diagnostikovaných případů rakoviny je včasná detekce onkomarkerů klíčová. Pokud se odhalí nádorové onemocnění v počátečních stádiích, výrazně se zlepší prognóza a pacient má vyšší šanci na přežití. Moderní terapie se ubírá směrem k individualizovanému přístupu, který umožňuje posoudit a zohlednit potřeby konkrétních pacientů. V personalizované medicíně mají biomarkery nezastupitelnou funkci. Z tohoto důvodu je vývoj vysoce citlivých a selektivních detekčních metod zásadní. Biosenzory založené na funkcionalizovaných nanomateriálech mohou poskytnout specifickou a rychlou diagnostiku s poměrně nízkými náklady, snadným použitím a potřebnou přenosností.

V bakalářské práci je uveden teoretický popis vlastností a výroby nanovláken, typů biosenzorů, personalizované medicíny a klinický význam stanovení onkomarkerů, který byl zaměřen především na karcinoembryonální antigen.

Praktická část práce se zabývá možností detekce karcinoembryonálního antigenu v tekutinách pomocí biosenzoru, který byl námi vytvořen na bázi protilátkou funkcionalizovaných polyakrylonitrilových nanovláken.

Z výsledků vyplývá, že připravený biosenzor je schopný detekovat karcinoembryonální antigen v tekutinách v koncentraci od 0,025 do 25 ng/ml. Připravený biosenzor by mohl v budoucnu nalézt uplatnění v oblasti laboratorní imunodiagnostiky při stanovení nádorových onemocnění.

Klíčová slova

Imunosenzory; detekce karcinoembryonálního antigenu; funkcionalizace nanovláken; personalizovaná medicína; onkomarkery; nanovlákná; polyakrylonitril

ABSTRACT

Given the increasing number of newly diagnosed cancer cases, early detection of oncomarkers is crucial. In case of early stage cancer detection, the prognosis significantly improves and the patient has a better chance of survival. Modern therapy is moving towards an individualised approach that allows the needs of specific patients to be assessed and taken into account. In personalised medicine, biomarkers have an irreplaceable function. For this reason, the development of highly sensitive and selective detection methods is essential. Biosensors based on functionalized nanomaterials can provide specific and rapid diagnostics with relatively low cost, ease of use and necessary portability.

The theoretical description of the properties and production of nanofibers, types of biosensors, personalized medicine and the clinical significance of oncomarker determination, which focused mainly on carcinoembryonic antigen, is presented in the bachelor thesis.

The practical part of the thesis deals with the possibility of detection of carcinoembryonic antigen in fluids by means of a biosensor, which was created by us on the basis of antibody-functionalized polyacrylonitrile nanofibers.

The results show that the prepared biosensor is capable of detecting carcinoembryonic antigen in fluids at concentrations ranging from 0.025 to 25 ng/ml. The prepared biosensor could find future applications in the field of laboratory immunodiagnostics for cancer detection.

Keywords

Immunosensors; carcinoembryonic antigen detection; nanofiber functionalization; personalized medicine; oncomarkers; nanofibers; polyacrylonitrile

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Nanovlákná	12
3.2	Výroba nanovláken	12
3.2.1	Jehlové a bezjehlové metody tvorby nanovláken	13
3.2.2	Princip elektrického zvlákňování	13
3.2.3	Elektrostatické zvlákňování z volné hladiny polymerních roztoků	14
3.2.4	Zařízení na výrobu nanovláken.....	14
3.2.5	Střídavé elektrické zvlákňování.....	15
3.2.6	Další metody výroby nanovláken	17
3.2.7	Parametry výrobního procesu.....	17
3.3	Polymery a rozpouštědla pro výrobu biokompatibilních a biodegradabilních nanovláken	18
3.3.1	Polyakrylonitrilová (PAN) nanovlákná	19
3.3.2	Vliv výrobních parametrů na vlastnosti PAN nanovláken.....	20
3.4	Využití nanovláken v medicíně.....	21
3.5	Funkcionalizace nanovláken.....	22
3.6	Biosenzory	24
3.6.1	Imunosenzory a jejich typy	26
3.6.2	Využití biosenzorů na bázi funkcionalizovaných nanovláken v teranostice	28

3.7	Personalizovaná medicína	28
3.7.1	Historie personalizované medicíny.....	28
3.7.2	Zefektivnění léčby rakoviny pomocí personalizované medicíny .	29
3.7.3	Úloha biomarkerů v personalizované medicíně	30
3.7.4	Význam organoidů v personalizované medicíně	30
3.8	Antigeny.....	31
3.9	Maligní proces v buňce	32
3.10	Onkomarkery	33
3.10.1	Vlastnosti ideálního nádorového markeru.....	33
3.10.2	Klasifikace	34
3.10.3	Klinické využití	35
3.10.4	Karcinoembryonální antigen.....	36
3.10.5	Detekce CEA.....	38
3.11	Vybrané metody detekce bílkovin	39
3.11.1	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	39
3.11.2	Biuretová reakce.....	40
4	Metodika.....	41
4.1	Výroba biosenzoru pro detekci karcinoembryonálního antigenu	42
4.1.1	Příprava nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování	42
4.1.2	Kontrola nanovláken pomocí SEM mikroskopie	44
4.1.3	Parametry výrobního procesu nanovláken.....	45
4.1.4	Redukce nanovláken	46
4.1.5	Funkcionalizace nanovláken protilátkami a určení jejich koncentrace metodou FTIR	46

4.1.6	Příprava potřebných roztoků	48
4.1.7	Detekce CEA	49
4.1.8	Měření absorbance	52
5	Výsledky	54
5.1	Výsledná spektra FTIR	54
5.2	Výsledná intenzita PAN nanovláken	56
5.3	Výsledná absorbance PAN nanovláken	59
6	Diskuze	61
7	Závěr	65
8	Seznam použitých zkratk	66
9	Seznam použité literatury	68
10	Seznam použitých obrázků	84
11	Seznam použitých tabulek	86

1 ÚVOD

Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě, ročně je diagnostikováno více než deset milionů případů. Technologie, které dokážou spolehlivě detekovat nízké koncentrace onkomarkerů, mají zásadní význam pro včasnou diagnostiku onemocnění, poskytují lepší prognózu a terapeutické monitorování. Personalizovaná medicína rovněž využívá velmi citlivého stanovení biomarkerů při různých metodách léčby [1].

V současné době je většina metod detekce biomarkerů založena na fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), sekvenování nové generace, imunohistochemii a polymerázové řetězové reakci (PCR). Tyto techniky jsou nákladné, časově náročné a vyžadují vysoce kvalifikované pracovníky. Biosenzory jsou efektivní alternativou, která umožňuje specifickou a rychlou diagnostiku a minimalizuje nevýhody rutinně využívaných technik [2].

Biosenzory, které byly vytvořeny s použitím nanovláken a následně zkombinovány s technikami imunosenzoriky mohou realizovat vysoce výkonnou a ultrasenzitivní detekci, která je přesnější než ELISA. Nejdůležitější částí procesu výroby imunosenzoru je imobilizace specifické protilátky na nanovlákněný povrch. Pro stanovení biomarkerů rakoviny se využívá interakce protilátky s antigenem [2; 3; 4].

Náplní této práce je vytvořit a otestovat imunosenzor, který by dokázal spolehlivě detekovat karcinoembryonální antigen v tekutinách. Přesný postup funkcionalizace nanovlákněného povrchu protilátkou je předmětem patentového řízení.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je přispět k rozvoji aplikace funkcionalizovaných nanovláken v personalizované medicíně. Bakalářská práce se zaměřuje na časnou detekci závažných onemocnění pomocí ultrasenzitivního bionanosenzoru.

Teoretická část této práce má za cíl podat ucelené informace o výrobě nanovláken, jejich funkcionalizaci a aplikaci v medicíně. Další část seznamuje s personalizovanou medicínou, teranostikou a onkomarkery se zaměřením na karcinoembryonální antigen.

Praktická část se zaměřuje na charakteristiku a vlastnosti aktivní vrstvy neboli bioreceptoru ultrasenzitivního bionanosenzoru, který je schopný identifikace a *in vitro* imobilizace karcinoembryonálního antigenu v tekutinách.

Efektivní stanovení onkomarkeru by mělo umožnit včasnou diagnostiku nádorového onemocnění a zdokonalit tradiční metody léčby.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Nanovláknna

Nanovláknno je válcově symetrický útvar, jehož délka je mnohonásobně větší než průměr, který je menší než 1 mikrometr. Průměry nanovláken jsou velmi variabilní a řídí se typem aplikace. Obvykle se pohybují od desítek nanometrů a dosahují až po jednotky mikrometrů. Nejčastěji se setkáváme s nanovláknny o velikosti 100 až 750 nm, v závislosti na použitém polymeru a metodě výroby. Předností nanovláken je jejich obrovský měrný povrch a malá velikost pórů, přes které neprojdou bakterie ani viry, propustí ale molekuly vzduchu [5; 6; 7].

3.2 Výroba nanovláken

Vývoj v oblasti nanovláken je velmi rychle se rozvíjející vědní obor. Své hojné uplatnění nachází zejména v posledních desetiletích. Nanovláknenné materiály nacházejí široké uplatnění v různých oborech průmyslu. Nalézáme je jako součást textilních výrobků, ochranných materiálů, které mohou být antibakteriální, chránící proti UV nebo elektromagnetickým vlnám. Vyskytují se jako součást hygienických výrobků, kosmetických přípravků, ve filtrech, jako zvukové a tepelné izolace. Ve zdravotnictví se využívají v biomedicíně, kde mohou jako nosiče zefektivnit podávání léčiv a protinádorovou imunoterapii s využitím nanovakcín. V tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně nacházejí své uplatnění jako implantáty v ortopedii, zubním lékařství nebo při léčbě rakoviny. Své uplatnění nacházejí jako nosiče pro tkáňové kultury při výrobě obvazů, které umožňují snadnější hojení kožních poranění. V bioinženýrství se používají k výrobě různých sond. Mezi další aplikace v oblasti nanomedicíny patří separace a analýza antigenů, protilátek, biomarkerů, proteinů, vitaminů a vezikul [8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17].

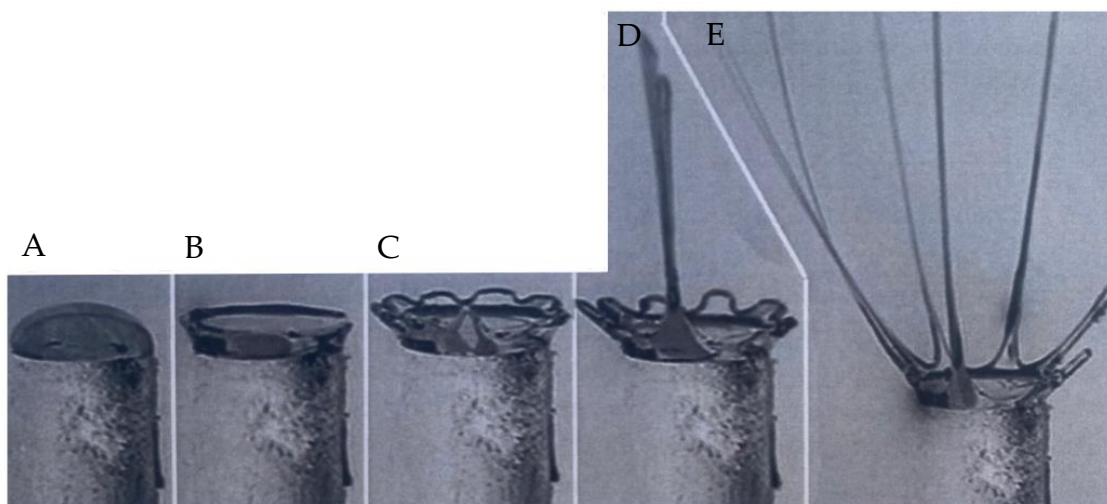
3.2.1 Jehlové a bezjehlové metody tvorby nanovláken

Ve dvacátém století se nanovlákná vyráběla za pomoci jehlových neboli kapilárních zvlákňovacích zařízení. Jehlové pole se skládalo z mnoha kapilár, na každé se ale zpravidla vytvořila jen jedna tryska. Aby se zvýšila zvlákňovací kapacita došlo k zavedení bezjehlových metod. Výhodou je, že se polymerní trysky vytvářejí samovolně na povrchu roztoku polymeru. Vznikne větší množství trysek, které poté tuhnou a vytvářejí nanovlákná. V obou metodách je zapotřebí stejnosměrný proud (DC) o vysokém napětí [10].

Technologie nacházela stále větší uplatnění, jelikož se jedná o univerzální a poměrně jednoduchou metodu výroby. V dnešní době se nanovlákná nejčastěji vyrábějí metodou elektrostatického zvlákňování (electrospinning). Působením vnějšího elektrického pole dochází k destabilizaci hladiny polymerního roztoku. Při tvorbě nanovlákná záleží na intenzitě elektrického pole, které na kapku polymeru působí [10].

3.2.2 Princip elektrického zvlákňování

Na anodu, která je připojena k vysokonapěťovému kladnému zdroji, se nanese kapka polymeru. Do vzdálenosti cca 20–30 cm od anody se umístí deskový uzemněný kolektor. Pokud se zvyšuje potenciálový rozdíl mezi anodou a katodou na povrchu kapaliny vzniká kladný náboj. Náboj je přitahován záporně nabitou katodou (kolektorem). Zároveň se kladný náboj na hladině odpuzuje s kladným nábojem anody, kapka se přemění na tvar připomínající mističku (Obrázek 1 B). Pokud se intenzita opět zvýší na okraji můžeme pozorovat vznik stacionární vlny (Obrázek 1 C a D). Překročí-li intenzita kritickou mez, z každé vlny vzniká kapalinová tryska (Obrázek 1 D a E). Z každé trysky vznikne jedno nanovlákná [10].



Obrázek 1 – Chování kapky polymeru podle intenzity elektrického pole
 A) Kapka polymeru bez působení elektrického pole, B) Kapka připomínající tvar mističky, C) Stacionární vlny na hladině kapky, D) Stacionární vlny a vznikající tryska, E) Kapalinové trysky [10]

3.2.3 Elektrostatické zvlákňování z volné hladiny polymerních roztoků

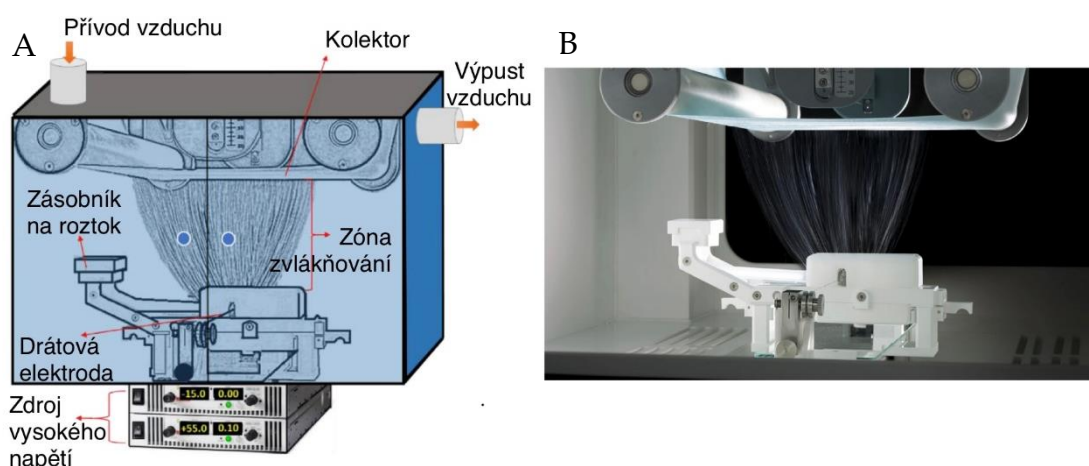
Jedná se o proces, při kterém na polymerní roztok působí vnější elektrické pole o nadprahové intenzitě a na celé hladině roztoku dochází k samoorganizovanému vzniku nanovláken. Zařízení, která jsou určena ke zvlákňování nejsou konstrukčně složitá. Elektrostatické zvlákňovače fungují na principu fyzikálních jevů, které probíhají v chronologickém pořadí. Dochází k destabilizaci volné hladiny roztoku polymeru, poté se vytvoří trysky, které se prodlužují a vznikají nanovlákná [10; 18].

3.2.4 Zařízení na výrobu nanovláken

Metoda elektrostatického zvlákňování nachází obchodní využití pod názvem Nanospider™. Liberecká společnost Elmarco, působící na trhu od roku 2004, dodává výrobní stroje Nanospider™. První generace strojů byla zkonstruována tak, že ke koncentraci elektrostatického pole využívala vodorovně se otáčející válec, na který byla nanesena slabá vrstva roztoku polymeru. Druhá generace

se na trhu objevila v roce 2010, inovací byla výměna válce za tenkou vodivou strunu. V současnosti jsou zařízení schopna produkovat velmi kvalitní nanovlákná v průmyslovém měřítku [10; 18].

Nanospider™ technologie využívá jako zvlákňovací elektrodu tenkou strunu, na níž se pohybuje hlava naplněná roztokem polymeru, která roztok rovnoměrně nanáší. Na vrstvě roztoku polymeru, se budou vlivem působení silného elektrostatického pole vytvářet nanovlákná (viz Obrázek 2) [18].



Obrázek 2 – Uspořádání zařízení Nanospider A) Schématické B) Reálné
[18; 19; upraveno]

3.2.5 Střídavé elektrické zvlákňování

Většina dosavadního vývoje a výzkumu se zaměřuje na DC zvlákňování. V tomto případě metoda využívá ke zvlákňování střídavé elektrické pole (AC) a má velmi vysokou produktivitu. Porovnáme-li DC zvlákňování s AC, zjistíme, že produktivita AC je daleko vyšší. Jedná se o bezjehlovou metodu, při které vzniká útvar podobný kouři, který se skládá z trysek nanovláken. Útvar byl nazván vlečka [10; 19].

Při této metodě byl odstraněn kolektor, neboť vlečka rychle stoupá od zvlákňovací elektrody, na kterou je přiváděno napětí 30 kV. Virtuální kolektor

neboli protielektroda vzniká samovolně z nově emitovaných nanovláken, které vytváří oblak ve vzdálenosti 30–40 mm od zvlákňovací elektrody. Díky vytvoření protielektrody vzniká na povrchu polymeru nadprahová intenzita pole a může docházet ke vzniku trysek. Svazky nanovláken vytvořené zvlákňovací elektrodou jsou nabitě pozitivně nebo negativně. Náboj závisí na půlvině proudu, který byl na elektrodu přiveden v době, kdy nanovláknko vzniklo. Nově vytvořené nanovláknko má opačný náboj než oblak v oblasti protielektrody, proto dochází k částečné rekombinaci a tvorbě vlečky. Vlečka je unášena elektrickým větrem, který je vytvořen zvlákňovací elektrodou. Vítr hraje v procesu velmi významnou roli, jelikož zabraňuje nově vzniklým nanovláknům navracení zpět na zvlákňovací elektrodu v době, kdy dojde ke změně polarity. Po rekombinaci v oblasti protielektrody jsou svazky nanovláken díky elektrickému větru odsunuty dále od zvlákňovací elektrody [10; 19].

Z nanovláknenné vlečky lze snadno vytvořit přízi, jelikož má ideální vlastnosti pro zakroucení. Můžeme tak vytvořit nitě o požadované struktuře. Pomocí bezjehlového a bezkolektorového zvlákňování lze vyrobit přízi tvořenou až z 80 % nanovláknny. Vyrobí se kompozitní příze s masivním nanovláknenným obalem. Rychlost výroby jde zvýšit z 10 metrů za minutu na 60 m/min přidají-li se zvlákňovací elektrody. Tato výroba kompozitních nanovláknenných přízí by mohla v budoucnu nalézt široké uplatnění, neboť se u ní nevyskytuje limitující faktor, kterým je kolektor v případě DC metody. Další výhodou je vyšší průtok polymerního roztoku. Textilie vyrobené metodou AC mají výrazně odlišné mechanické, sorpční a filtrační vlastnosti na rozdíl od materiálů vyrobených klasickým způsobem. Mají proto potenciál pro široké uplatnění v oblasti biomedicíny, textilním průmyslu, filtraci, environmentálních senzorech a vylepšených katalyzátorech [10; 19; 20].

3.2.6 Další metody výroby nanovláken

Nanovláknenné materiály lze vyrábět mnoha technikami. Nejběžněji užívanou metodou výroby nanovláken je v dnešní době stále metoda elektrostatického zvlákňování (Electrospinning). Mezi další způsoby výroby lze zařadit odstředivé zvlákňování (Centrifugal Spinning), samoorganizaci (Self-assembly), dloužení (Drawing) nebo foukání taveniny (Meltblowing). Při této metodě se využívají trysky s otvory, do kterých se přivádí tavenina, ta je teplým vzduchem vytlačena a následně dloužena. Další laboratorní metodou je způsob výroby nanovláken za použití přesně definovaných šablon (Template Synthesis), které mají velmi malé otvory, kterými se protlačuje polymer. Touto metodou lze připravit vlákna o průměru pouze několik nanometrů. Poslední zmíněnou neprůmyslově užívanou metodou je fázová separace (Phase Separation). Při této metodě nejprve vznikne zchlazením polymeru gel. Do gelu se zavede sublimující rozpouštědlo, které zcela nahradí původní, z něhož poté vznikne nanovláknenná pěna [5; 21; 22].

3.2.7 Parametry výrobního procesu

Vlastnosti nanovláken se dají ovlivnit mnoha parametry, záleží na vlastnostech a typu použitého polymeru, na velikosti přiváděného napětí, na tvaru elektrody a její vzdálenosti od kolektoru, na rychlosti přivádění roztoku k elektrodě, na vlhkosti a teplotě prostředí. Velkou roli hrají také parametry zvlákňovaného polymeru, mezi které patří chemické složení, molekulová hmotnost, rozpustnost, viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí a tenze par rozpouštědla. Důležitá je koncentrace polymeru stejně jako typ rozpouštědla [5; 22; 23; 24].

3.3 Polymery a rozpouštědla pro výrobu biokompatibilních a biodegradabilních nanovláken

Na nanovlákná aplikovaná v biomedicině jsou kladeny podstatně vyšší nároky než na ta, která jsou aplikovaná v jiných odvětvích. Nanovlákná by měla být biokompatibilní a také biodegradabilní. V dnešní době je snaha vyrábět materiály, které jsou schopny se začlenit do organismu, jsou tolerovány imunitním systémem a může docházet k vaskularizaci. Díky těmto vlastnostem je dosaženo lepší regenerace tkání. Je třeba vyrobit takové materiály, které mají srovnatelný čas odbourávání s dobou, která je potřeba k vytvoření nové tkáně [5; 6].

Biologicky rozložitelná nanovlákná jsou vyrobena z polymerů na bázi polyvinylalkoholu (PVA), poly(β -hydroxybutyrát- β -hydroxyvalerátu) (PHBV), poly(kyseliny mléčné a glykolové) (PLGA), poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) a kyseliny polymléčné (PLA), které obsahují různé biocidní látky pro biomedicínské aplikace. Do této skupiny můžeme zahrnout obvazy na rány, struktury pro efektivnější podávání léčiv a scaffoldy pro tkáňové inženýrství, což jsou nosiče, které po osazení buňkami slouží k jejich kultivaci [9].

K výrobě nanovláken se často používají vysoce toxická těkavá organická rozpouštědla nebo systémy rozpouštědel jako jsou chloroform, dimethylformamid (DMF), tetrahydrofuran (THF), dichlormethan (DCM), chloroform/methanol, DMF/THF a také DMF/chloroform. Tato organická rozpouštědla jsou zdrojem nebezpečí nejen pro obsluhu a životní prostředí, ale také pro koncové uživatele v podobě zbytkového rozpouštědla. Odstranění zbytkových rozpouštědel z elektrostaticky zvlákněného nanovlákná je obvykle složité. V případě biologicky rozložitelných implantátů by se při jejich degradaci mohla rozpouštědla uvolňovat a následně způsobit toxicitu pro okolní buňky. Všechna tato rozpouštědla se řadí do třídy 2 a jejich použití by mělo být omezeno.

Pro aplikace v tkáňovém inženýrství je třeba užívat rozpouštědla s nízkým toxickým potenciálem, která jsou zařazena do třídy 3. Mezi ně řadíme kyselinu mravenčí, kyselinu octovou, aceton a jejich vzájemné kombinace. Takto připravená nanovlákná jsou necytotoxická a biokompatibilní [25; 26].

3.3.1 Polyakrylonitrilová (PAN) nanovlákná

Polyakrylonitril (PAN) je stabilní polymer, jenž má výborné mechanické vlastnosti. Mezi jeho přednosti patří stabilita až do 300 °C, chemická stabilita a tolerance k většině rozpouštědel, bakteriím a záření, velký specifický povrch, vysoká pevnost, pórovitost, spřádatelnost, propustnost pro kyslík, ekologičnost a hydrofobicita [8; 24; 27; 28; 29].

Databáze TOXNET uvádí PAN jako netoxický, proto má velký potenciál pro širokou škálu aplikací, jednou z nich je lékařství. Modifikováním povrchu, které zajišťuje přítomnost nitrilových skupin, lze do jejich struktury inkorporovat různé látky s pozitivním vlivem na organismus. Modifikované struktury mohou sloužit v oblastech peroperačního výzkumu, k řízenému podávání léčiv, jako vylepšené kožní kryty ran nebo obvazy. Při modifikaci nanovláken s účinnou látkou lze urychlit fyziologický i patologický proces hojení. Začíná také vývoj chytrých náplastí, které léčí a zároveň monitorují proces hojení pomocí senzorů. PAN nanovlákná se již používají jako dialyzátory, které vylučují škodlivé látky [8; 27; 29].

V dnešní době nacházejí široké uplatnění oxidovaná PAN nanovlákná, která se získávají zahříváním kyseliny polyakrylové (PAA) a maleinanhydridu, což vede k oxidaci, zesíťování a tvorbě dlouhých molekul. Uplatnění nacházejí v elektronice, automobilovém průmyslu, železniční dopravě, lodním, výtahovém, leteckém a kosmickém průmyslu. Tato průmyslová odvětví vyžadují vysoce výkonné materiály za přijatelnou cenu, což oxidovaná PAN nanovlákná splňují. Poptávka se neustále zvyšuje, jelikož začínají nahrazovat kovy a plasty.

Díky své chemické struktuře má oxidovaný PAN vysokou mechanickou pevnost ve srovnání s jinými nanovláknami. Dále má vynikající elektrické vlastnosti, tuhost, odolnost a nízkou hustotu [30; 31].

Úroveň oxidace určuje pevnost, pružnost a další vlastnosti. PAN nanovlákná mohou být nízkou, středně a vysoce oxidovaná. Nízkou oxidovaná zahrnují termoplastický polymer, který lze po zahřátí na vysokou teplotu ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) snadno tvarovat. Střední oxidace přeměňuje PAN na sklovité materiály FiberGlassy, které mají vysokou pevnost v tahu, nízkou hustotu a vynikající odolnost proti korozi. Tato vlákna se používají v automobilovém průmyslu, v leteckých a kosmických konstrukcích nebo při výrobě lan. Vysoce oxidovaná PAN nanovlákná mají vysoký obsah kyslíku a to až 55 %. Vysoká odolnost, pevnost a schopnost odolávat oděru je předurčuje k použití v pneumatikách, železničních kolejích, lodních dílech, výtahových lanech, leteckých lanech a dalších. V budoucnu se očekává enormní nárůst globálního trhu s oxidovanými PAN, a to až o 55 % [30].

3.3.2 Vliv výrobních parametrů na vlastnosti PAN nanovláken

Hodnoty výrobních parametrů mohou zásadně ovlivnit výslednou morfologii nanovláken. PAN nanovlákná se vyrábí elektrostatickým zvlákňováním polymeru, který vznikne rozpuštěním PAN v DMF. Na výsledný produkt má vliv koncentrace roztoku PAN-DMF. Průměr vláken se zvyšuje z 208 nm na 881 nm s rostoucí koncentrací od 6 % do 12 %. S nárůstem rychlosti dávkování polymeru se zlepšila morfologie a zvětšil se průměr vláken. Po překročení stanovené hodnoty prahového napětí, dojde rovněž ke zvětšení průměru. Pokud rozšíříme zónu zvlákňování z 100 mm na 150 mm, průměr se téměř zčtyřnásobí. Se zvyšující se koncentrací se zvýšila pevnost a tažnost. Koncentrace má rovněž vliv na smáčivost, hydrofobnější byla nanovlákná vyrobená z koncentrovanějšího polymeru [24].

3.4 Využití nanovláken v medicíně

Využití nanovláken v medicíně je velmi široké. Lze je využít k výrobě materiálů pro náhrady kostí, chrupavek, cév, nervové tkáně, kožních krytů nebo očních implantátů užívaných k léčbě glaukomu. Scaffold neboli tkáňový nosič je vyroben tak, aby co nejlépe imitoval živočišnou tkáň. Vložíme-li scaffold do organismu, může pomoci při reparaci poškozené tkáně. Další možností je modifikace povrchu pomocí různých aktivních látek nebo buněk [6; 32].

V tkáňovém inženýrství se využívají scaffoldy, které mají optimální povrch pro osazení a růst buněk. Tímto způsobem byla vytvořena umělá trachea z kmenových buněk pacienta, která byla poté implantována do míst poškozených rakovinou. Dále lze využít nanovlákná k reparaci poškozených nervů nebo pro pěstování svalových buněk. Pro tyto účely byl nosič vytvořen z chitosan-PCL. V ideálním scaffoldu může docházet k diferenciaci mezenchymální kmenové buňky (MSCs) na buňky svalů, chrupavek, kostí, šlach, vazů i na buňky tukové [32; 33].

V regenerativní medicíně se můžeme setkat s želatinovými nanovlákná, která se připravují elektrostatickým zvlákněním z vodných roztoků okyselených kyselinou octovou. PLA a PGA rovněž vyráběná elektrostatickým zvlákněním jsou ideální jako nosiče tělních implantátů, jako nosiče pro řízené uvolňování léčiv nebo krytí ran. Pokud se k nim přidá 3-hydroxybutyrát lze je využít k léčbě tkání chrupavek [5].

Kryty ran by měly podporovat hojení a eliminovat vznik jizvové tkáně. Ránu musí chránit před kontaminací bakteriemi a zachovávat ideální vlhkost při hojení. Použití i odstranění z rány by mělo být jednoduché. Výhodou je možnost kryt modifikovat antimikrobiální aktivitou, která působí širokospektrálně a ideálně i na rezistentní bakterie. Jako aditivum je možné

použít antibakteriální látky nebo léčiva. Suprasorb X® je kryt vyrobený na základě regenerované celulózy [32].

Řízené uvolňování léčiv je pro pacienta vhodnější, jelikož dopraví léčivo do míst působení fyziologicky lepším způsobem a sníží tím zátěž pro organismus. Je založeno na dvou principech. Prvním je difuze a druhým rozpad matrice. Léčivo lze inkorporovat na povrch nanovláknů. Jiné typy umožňují zvláknit léčivo společně s polymerem do nanovláknenné struktury. Jindy se využívá různé rychlosti odbouratelnosti jednotlivých polyesterů tak, že se zkombinují do více vrstev. Vyrobit se nanovláknem ve tvaru trubice o průměru 400 až 600 nm. Na povrchu je plášť z biodegradabilního materiálu a uvnitř je dutina, která může být vyplněna biologicky aktivní látkou, jedná se o tzv. core-shell nanovláknem. Hydroxypropylmethylceluloza (HPMC) je hojně používaný polymer pro účely řízeného podávání léčiv, zlepšuje rozpouštění látek jinak špatně rozpustných ve vodě díky velkému měrnému povrchu. Ve studii byl jako modelové léčivo použit spironolakton a jako sekundárně přidávaný polymer polyethylenoxid (PEO). Další výzkum se zabýval optimalizací podáním ibuprofenu, protože je špatně rozpustný ve vodě a rychlost rozpouštění je omezena střevní absorpcí. Hydrofilní polyvinylpyrrolidon (PVP) byl společně s ibuprofenem rozpuštěn v etanolu a poté elektrostaticky zvlákněn. U perorálně podaného léku v této formě bylo pozorováno výrazné zvýšení gastrointestinální absorpce [5; 6; 32; 34; 35].

3.5 Funkcionalizace nanovláken

Funkcionalizace nanovláken je specifický proces úpravy povrchu. Tato fyzikální nebo chemická funkcionalizace vede k připojení a imobilizaci specifických biomolekul. Imobilizace probíhá díky mezimolekulovým interakcím, jako jsou Van der Waalsovy síly, vodíková vazba a hydrofobní

interakce. Chemický způsob funkcionalizace je charakteristický stabilnější kovalentní vazbou, která se vyskytuje ve funkčních skupinách primárních aminů, karboxylových skupinách, thiolech, karbonylech a u sacharidů při oxidaci nebo redukci [1].

Předpokladem kvalitní funkcionalizace je přítomnost dostatečného množství funkčních skupin. Dalším kritériem je velký povrch na jednotku objemu, ideální průměr vlákna a velikost pórů. Nitrilové skupiny na polyakrylových vláknech lze redukovat na aminoskupiny nebo oxidovat, jak již bylo popsáno výše. Reakcí bifunkčních činidel s funkčními skupinami lze na povrch inkorporovat protilátky. Procesem imobilizace lze kovalentně vázat různé molekuly na povrch nanovláken [27; 36].

V průmyslu se stabilizace polyakrylonitrilových vláken obvykle provádí za přítomnosti kyslíku. Výsledná exotermická reakce je způsobena reakcí vláken s kyslíkem. Stabilizaci lze provádět i v inertní atmosféře. Je mnoho mechanismů funkcionalizace pomocí oxidační reakce, jednou z nich je cyklizace a dehydrogenace. Další možností je vznik struktury s etherovými spoji, které jsou spojeny kyslíkovými můstky. Wat navrhl žebříčkovou strukturu, v níž je kyslík vzniklý oxidací vložen do struktury ketonové skupiny. Clarke a spol. navrhli model, podle něhož z hydroxyridinové struktury polyakrylonitrilových vláken snadno vznikají oxidy a hydroperoxy, které lze převést na ketonové a aromatické struktury [31].

Povrchově modifikovaná polyakrylonitrilová nanovláknina byla použita pro detekci protilátek v imunoanalýze. Sendvičová ELISA s PAN nanovláknem byla schopna přesně stanovit velmi nízké koncentrace protilátek. Citlivost testu byla daleko vyšší než u konvenční destičkové metody. Systém byl použit také pro stanovení protilátek z krve. Vědci dospěli k závěru, že pomocí

imunoanalýzy na funkcionalizovaných PAN nanovláčkách lze detekovat protilátky z tělních tekutin. Ke stanovení protilátek pomocí modifikovaných nanovláken stačilo pouhých 0,1 µl lidské krve. Výhodou metody je nízký detekční limit, vyšší specifičnost, dobrá reprodukovatelnost, univerzálnost, snadná separace a detekce volných a vázaných molekul. Funkcionalizovaná nanovláčka mají velký potenciál pro použití v oblasti laboratorní imunodiagnostiky při stanovení nádorových a infekčních onemocnění, autoimunitních poruch a alergií [29; 36].

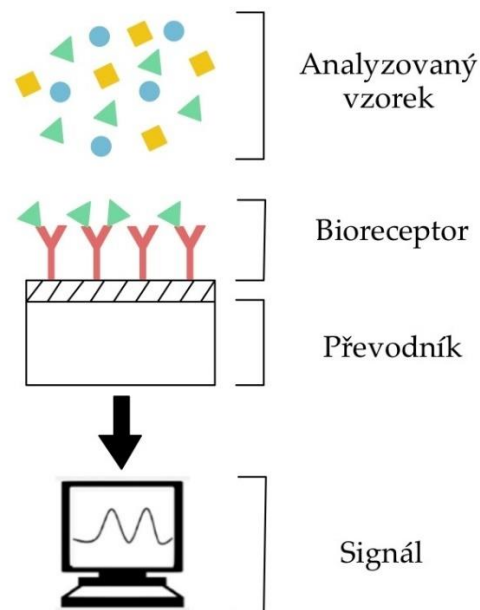
Funkcionalizací lze optimalizovat použití, při hydrolyzaci, následném chlorování a navázání kaseinu se zlepšila schopnost absorbovat vlhkost a zadržovat vodu. Modifikovaná vlákna PAN se používají k imobilizaci různých enzymů pro průmyslové a biomedicínské aplikace [36].

3.6 Biosenzory

Biosenzor je malé analytické zařízení, jehož výstupní signál koreluje s koncentrací cílového analytu ve vzorku. Generovaný signál je úměrný množství cílového analytu ve specifické reakci. Biosenzor je schematicky znázorněn na Obrázku 3 a skládá se z bioreceptoru a převodníku. Bioreceptor má za úkol detekovat analyt. Bioreceptory mohou mít podobu enzymů, proteinů, DNA, RNA, buněk, receptorů, antigenů nebo protilátek. Bioreceptory jsou imobilizovány buď na polymer nebo dovnitř polymeru, jelikož zvyšují selektivitu biosenzorů. Jakmile bioreceptory interagují s analytem, vznikne signál v podobě tepla, náboje, změny hmotnosti nebo pH [1; 37; 38].

Úkolem převodníku je zpracovat informace z bioreceptoru, které jsou následně převedeny na měřitelný signál. Signál pak může být zobrazen v podobě grafů, čísel nebo obrázků, které jsou pro uživatele srozumitelné [38].

Biosenzory lze rozdělit na základě způsobu přeměny signálu na elektrochemické, elektrochemiluminiscenční a fotoelektrochemické biosenzory. V závislosti na bioreceptoru je lze dělit na biosenzory DNA, enzymové biosenzory, imunosenzory, buněčné biosenzory, tkáňové biosenzory, biosenzory s molekulárním otiskem [39].



Obrázek 3 – Schéma biosenzoru [39; upraveno]

Biosenzory lze použít v mnoha oblastech, například v zemědělství, k analýze bezpečnosti potravin, detekci bakterií, monitorování životního prostředí. Hlavní využití však nalézají ve zdravotnictví. Zde se využívají k diagnostice nemocí, k monitorování hladiny látek a léčiv v organismu. Biosenzory nabízejí jednoduchou, levnou a citlivou analýzu, která je zapotřebí při monitorování diabetu, alergických reakcí, odhalení patogenních infekcí, včasnou diagnostiku HIV nebo rakoviny. Díky těmto vlastnostem se staly alternativou k poměrně nákladným a časově náročným běžně využívaným laboratorním testům. Jejich využití lze nalézt i při testování přímo v místě péče (POCT) [37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44].

Vzhledem k celosvětovému nárůstu výskytu rakoviny jsou nově vyvíjené metody, které umožní její včasné odhalení, skutečně velkým přínosem. Stanovení nízkých koncentrací biomarkerů v matricích bylo dříve technicky náročné, ale výborná detekční schopnost biosenzorů otevírá široké možnosti využití v diagnostice a terapii. Biosenzory lze využít k detekci různých biomarkerů. Vyvinuty byly senzory pro PSA, CA 125, CA 15-3, AFP, hCG, nádorový supresorový protein p53 a mnoho dalších. Vzhledem k tomu, že je pro diagnostiku a monitorování rakoviny potřeba stanovit více markerů, bylo by ideální vyvinout biosenzor, který by dokázal detekovat několik biomarkerů současně [3; 37; 38; 39; 43].

3.6.1 Imunosenzory a jejich typy

Imunosenzory jsou v podstatě zdokonalením imunoanalýz. Je to třída biosenzorů založená na specifické rozpoznávací funkci antigenu a protilátky. Imunosenzory obecně implementují protilátky nebo antigeny jako rozpoznávací prvky pro detekci cílových molekul. Ve srovnání s jinými detekčními metodami má elektrochemický imunosenzor výhodu vysoké citlivosti, vysoké specifity, selektivity, nízkých nákladů, rychlého měření, jednoduchého použití a praktické velikosti, proto jsou vhodné i pro stanovení analytů v terénu [3; 37; 38; 43].

Elektrochemický imunosenzor funguje na principu měření elektrického signálu, lze měřit proud, potenciál nebo impedanci. Změřená hodnota koreluje s množstvím vytvořeného komplexu antigenu s protilátkou. Elektrochemické biosenzory jsou založeny na oxidačně-redukčních reakcích. Pomocí elektrochemického imunosenzoru lze stanovit například hodnotu C-reaktivního proteinu (CRP) [1; 38; 44].

Optické imunosenzory využívají k detekci analytů metody založené na chemiluminiscenci, absorpci světla, fluorescenci, fosforescenci, rozptylu v temném poli, Ramanově rozptylu, polarizaci a rotaci světla,

příčemž nejrozšířenější je povrchová plazmonová rezonance. Imunosenzory na bázi optiky pozorují změnu fáze, rychlosti polarizace nebo frekvence vstupního světla, která odpovídá tvorbě komplexu antigen-protilátka. Optické imunosenzory obvykle využívají světlo pocházející buď z laseru, diody nebo žárovky s bílým světlem a umožňují pozorování změn vlastností světla odraženého od senzoru nebo jím procházejícího. Výhodou toho typu biosenzoru je energetická úspora a možnost detekce v reálném čase. Nejčastěji se používají k detekci nukleových kyselin a antigenů [38; 44; 45].

Piezoelektrický imunosenzor využívá hmotnostní citlivost piezoelektrického křemenného krystalu v závislosti na specifickou interakci protilátka-antigen. Výhodou piezoelektrického imunosenzoru je jeho schopnost detekovat analyty v reálném čase. Byly vyvinuty vysoce citlivé piezoelektrické biosenzory pro detekci toxinu cholery, hepatitidy a potravinových patogenů [38; 44].

Termometrický imunosenzor detekuje tepelné změny, které nastávají jako důsledek specifické reakce analytu s protilátkou nebo antigenem a odpovídají koncentraci sledovaného analytu. Při reakci může být teplo uvolněno nebo absorbováno. Změnu teploty lze přímo převést na elektrický signál. Termometrický imunosenzor byl využit při detekci faktoru nádorové nekrózy (TNF- α), proteinu spojeného s Alzheimerovou chorobou, rakovinou a zánětlivými onemocněními. Ve studii byl využíván sendvičový formát s enzymem glukózooxidázou, který byl konjugován s protilátkami. Enzymatická reakce mezi glukózooxidázou a jejím substrátem produkuje teplo, které je následně termoelektrickým senzorem transformováno na elektrický signál. Pomocí tohoto typu imunosenzoru lze také detekovat hybridizace DNA [38; 44].

3.6.2 Využití biosenzorů na bázi funkcionalizovaných nanovláken v teranostice

Teranostika je termín, který vznikl integrací slov TERapie a diagNOSTIKA. Začlenění nanotechnologií do oblasti diagnostiky představuje zcela nové možnosti v terapii a diagnostice široké škály nemocí. Imunosenzory na bázi funkcionalizovaných nanomateriálů se používají pro diagnostiku nemocí, genetických vad a detekci patogenů. Použití nanomateriálů vedlo ke zlepšení analytických vlastností imunosenzorů. Byla zaznamenána lepší citlivost, stabilita, životnost, zesílení generovaného signálu a zároveň bylo umožněno opětovné použití a recyklace drahých enzymů. Funkcionalizací se rovněž zvýšila selektivita mnoha biosenzorů. Systémy na bázi nanovláken byly téměř desetkrát výkonnější oproti systémům na tenké vrstvě. Dalšími výhodami imunosenzorů jsou biokompatibilita a relativně nízké náklady, díky tomu jsou schopné dobře konkurovat metodě ELISA [1; 2; 37; 38; 43; 44; 46; 47; 48].

Bylo také dokázáno, že imunosenzory na bázi nanomateriálů lze použít jako kvantitativní analytické nástroje pro detekci bioanalytů, které mají souvislost s rakovinou. Mezi ně patří nukleové kyseliny, geny, genové sekvence, proteiny, hormony, dokonce i cirkulující rakovinné buňky. Biomarkery přítomné v nádorech, krvi, moči, stolici nebo jiných tělních tekutinách a tkáních mají úzký vztah k detekci rakoviny, což je zásadní pro screening, diagnostiku a terapeutickou stratifikaci pacientů. Biomarkery díky tomu, že usnadňují kombinaci terapie s diagnostikou, budou hrát důležitou roli ve vývoji personalizované medicíny [1; 37; 38; 41; 43; 46; 47].

3.7 Personalizovaná medicína

3.7.1 Historie personalizované medicíny

Pojem personalizovaná medicína (PM) poprvé použil K. K. Jain ve stejnojmenné knize v roce 1998. Základy byly položeny o 90 let dříve zavedením pojmu gen, genotyp a fenotyp. V roce 1931 sir Garrod vyslovil

myšlenku, že genetika má velký vliv při reakci organismu na léčbu. V roce 1953 Watson a Crick popsali strukturu DNA. Další významnou roli pro vznik PM hrál objev radioimunoanalýzy, položení základů farmakogenetiky a objev polymerázové řetězové reakce (PCR). Mezi roky 1990 a 2000 byl zaznamenán velký rozvoj genomiky a molekulárních nanotechnologií. Vrcholem bylo dokončení kompletní sekvenace lidského genomu v roce 2003. Díky těmto znalostem mohl být položen základ PM. V ČR je PM zaměřena především na léčbu onkologických pacientů a znalosti PM se stále více uplatňují v rutinní praxi. PM se dále uplatňuje při diagnostice a léčbě vzácných genetických onemocnění. Na základě specifických genetických znaků lze navrhnout terapeutickou stratifikaci pro jednotlivé pacienty, což může v konečném důsledku vést ke zlepšení léčebných výsledků [49; 50; 51].

3.7.2 Zefektivnění léčby rakoviny pomocí personalizované medicíny

Rakovina je skupina onemocnění, která se vyznačuje nekontrolovanou buněčnou proliferací, invazí do tkání, někdy metastazováním a je jednou z hlavních příčin úmrtí na světě. Selhání léčby u pacientů s primárním i metastatickým nádorovým onemocněním, způsobeným chemorezistencí a radiorezistencí, posílilo výzkum v oblasti léčby rakoviny pomocí PM. Potenciál PM je obrovský a má za cíl zlepšit současné léčebné postupy, což vede k dřívější diagnostice, vyšší úspěšnosti léčby, zlepšení prognózy, prodloužení doby přežití a zlepšení kvality života pacienta. PM je léčebný postup založený na znalosti genomického profilu pacienta [52; 53; 54; 55].

"Vize" PM zahrnuje měření některých zásadních charakteristik nádoru, které napomáhají tomu, aby se léčba optimalizovala na míru každému pacientovi, úspěšně suprimovala onemocnění a zabránila relapsu. Využití nových molekulárních analýz vedlo v oblasti výzkumu ke shromáždění obrovského množství dat. S rozvojem sekvenování byla objasněna genetická

informace různých nádorů, která byla předpokladem pro vývoj a výzkum molekulárně cílených chemoterapeutik. Všechny aspekty vedly k tomu, že se PM v této oblasti stala klinicky dostupnější [52; 53].

3.7.3 Úloha biomarkerů v personalizované medicíně

Cílem je zefektivnit stanovení onkomarkerů a umožnit včasnou diagnostiku nádorových onemocnění. Díky stanovení nádorových biomarkerů lze získat specifické informace o rakovině, jako je agresivita, umožňují sledovat reakci nádorové tkáně na zvolený typ léčby a pomáhají nám tak rozhodnout o nejefektivnějším způsobu terapie. Laboratorní stanovení biomarkerů pomáhá personalizovat a zefektivnit tradiční metody léčby rakoviny a je stále více klinicky relevantní. Biomarkery používané v PM mohou být geny, genové produkty, specifické buňky, molekuly, enzymy nebo hormony, které lze detekovat v krvi, moči, tkáních nebo jiných tělesných tekutinách. PM se zabývá standardizací kritérií a pokynů pro diagnostiku, prognózu a léčbu na základě nových biomarkerů, což vede ke zlepšení postupu při léčbě onemocnění s ohledem na proteomiku a metabolomiku. Konfirmační studie slouží k prokázání přesnosti biomarkerů, poté je možné spolehlivěji identifikovat heterogenitu nádorového systému, zajistit lepší stratifikaci nádorů a vývoj efektivnějších agonistů a antagonistů léčiv [37; 47; 54; 56; 57; 58].

3.7.4 Význam organoidů v personalizované medicíně

V ideálním případě by se PM měla řídit genomickým profilem s ohledem na heterogenitu pacientova nádoru. Molekulární profilování je stále užitečnější při hledání nových biomarkerů, vývoji screeningových metod a cílených terapeutických léčiv. Nový pokrok v oblasti PM představují buněčné linie odvozené od nádorů pacientů, které jsou velmi užitečné pro identifikaci charakteristických fenotypů a určení citlivosti na protinádorové léky i molekulárně cílené terapie [52; 53; 58].

Organoid je orgánově specifický shluk buněk, který vznikl samoorganizací. Autoři M. Shiihara a T. Furukawa ho alternativně nazývají „zmenšenina orgánu“. Organoid je in vitro model s kultivovanými buňkami, které tvoří trojrozměrnou strukturu a dědí fenotyp a genové mutace primárního nádoru. Organoidy mají schopnost sebeobnovy a mohou se uspořádat tak, aby se strukturou i funkcí podobaly původnímu orgánu nebo nádoru, proto jsou vhodnější než konvenční 2D buněčné linie nebo xenografty, což jsou štěpy, které pocházejí z jiného organismu. Podle nejnovějších studií dochází u organoidů k malým genomickým změnám, i po dlouhodobé kultivaci, stejně jako je tomu v těle pacienta. Proto se očekává, že organoidy, odvozené a kultivované ze vzorků nádorů v raném i pozdním stádiu, budou společně s biomarkery významné při navrhování personalizované léčby rakoviny [52; 53; 57; 59].

3.8 Antigeny

Antigen je látka, na kterou reaguje imunitní systém a která dokáže vyvolat imunitní reakci organismu. Antigeny lze rozdělit na autoantigeny a exoantigeny, které pochází ze zevního prostředí organismu. Chemickou podstatou antigenu je protein nebo glykoprotein. Můžeme nacházet i antigeny cukerné a tukové povahy, které se mohou vyskytovat v různých komplexech. Imunitní systém je schopný reagovat na molekulu, jejíž relativní hmotnost je alespoň 10 000. Nejprve ji vyhledá, rozezná a následně na ni reaguje. Část antigenu, kterou je schopný identifikovat specifický receptor, se nazývá epitop. Pokud je kompatibilní vazebné místo protilátky s antigenem, dojde mezi nimi k vytvoření kovalentní vazby, výsledný produkt se nazývá imunokomplex. Velmi specifické reakce antigenu a protilátky se využívá v mnoha imunochemických metodách [60; 61; 62; 63].

3.9 Maligní proces v buňce

Maligní zvrát buňky může nastat v organismu z mnoha příčin. V buňce může dojít k mutaci genů, které kódují vznik bílkovin nebo mohou být narušeny další důležité procesy v buňce. Jedná se třeba o proces regulace adhezivity, transkripce nebo apoptózy. Zmutované buňky se mohou začít nekontrolovatelně dělit. Z tohoto důvodu může docházet ke tkáňové změně lokalizace buňky a invazivnímu růstu. Je narušen imunitní dohled v organismu, což znamená, že imunitní systém není schopen rozpoznat změněné buňky a odstranit je. Maligní buňky se v některých ohledech liší od mateřských, proto by měly být eliminovány, ale v praxi je imunitním systémem nedokáže rozpoznat. Jsou buď velmi malé nebo si vytvořily obranné mechanismy, díky kterým zůstávají skryté a imunitní systém je v této podobě není schopen rozpoznat a degradovat [60].

Molekulární mechanismy v buňce vykazují změny v expresi více genů, mezi něž většinou patří onkogeny, tumor supresorové geny a geny pro opravu DNA, které přispívají ke vzniku nádorového genotypu a fenotypu. Rakovinový proces se vyznačuje dysregulací buněčných proliferačních dějů, rezistencí k apoptóze, indukci angiogeneze, aktivací invaze do okolní tkáně nebo metastazováním. Vyskytuje se stále více důkazů, že rakovina může být vyvolána epigenetickými změnami, mezi něž patří modifikace histonů a změna metylace DNA, které způsobují změny v kondenzačním stavu chromatinu. Genetické změny nádorových buněk, jako např. bodové mutace, přestavby nebo amplifikace genů a následné poruchy dělení a proliferace buněk, se u většiny pacientů s určitým typem rakoviny projeví uvolněním biomarkerů těchto změn. Proto je lze využít jako biomarkery pro detekci nádorových onemocnění nebo pro predikci odpovědi na různé druhy léčby. Komplexní pochopení změněných molekulárních mechanismů a buněčných procesů, které jsou základem karcinogeneze nebo charakteristických znaků rakoviny, může propojit nádorové

biomarkery a jejich klinickou využitelnost u onkologických pacientů. Genetické, molekulární a metabolické biomarkery mohou být identifikovány pomocí sekvence dějů probíhajících v nádorových buňkách od mutace genů po jejich vliv na buněčnou proliferaci a metabolismus [47].

Jedním z hlavních úkolů onkologického výzkumu je stanovit jednoznačný vztah mezi nádorovými biomarkery a nádorovou patologií. Kromě vývoje cílené léčby zaměřené na přesně změněný gen nebo buněčný proces, také odhalit rakovinu v co nejranějším stadiu [47].

3.10 Onkomarkery

Nádorové markery, nazývané jako onkomarkery nebo tumorové markery (TM), jsou molekuly produkované maligně změněnými buňkami nebo organismem jako důsledek nádorového bujení. Lze je rozdělit na humorální a celulární. Celulární nacházíme v buňkách a tkáních tumoru. Humorální cirkulují v tělních tekutinách a detekujeme je imunoanalytickými metodami [64; 65].

3.10.1 Vlastnosti ideálního nádorového markeru

Ideální nádorový marker by měl splňovat řadu kritérií. Jeho produkce by měla být orgánově specifická a přítomná pouze u maligních onemocnění, hladina by měla být vysoká a korelovat s velikostí nádoru, se stádiem onemocnění, s prognózou i s účinností terapie. TM, který by požadavky splňoval zatím neexistuje. Specifita a senzitivita se zatím ani zdaleka nepřibližují stům procent. Proto jsou vyšetření často limitována a zvýšené hladiny nemusí definitivně znamenat onemocnění. Přesto jsou využívány, jelikož umožňují posouzení dynamiky nádorové aktivity, stanovení diagnózy, prognózy, sledování recidivy, metastáz i hodnocení účinků chemoterapie. V praxi se stanovují hladiny více markerů a v průběhu onemocnění se měření provádí opakovaně. Klinická diagnóza je schopna odhalit nádor o velikosti 10^9 buněk, v případě nádorových

markerů je tato hodnota o tři řády nižší a v ideálních případech lze odhalit útvar vážící 1 mg [64; 66; 67].

3.10.2 Klasifikace

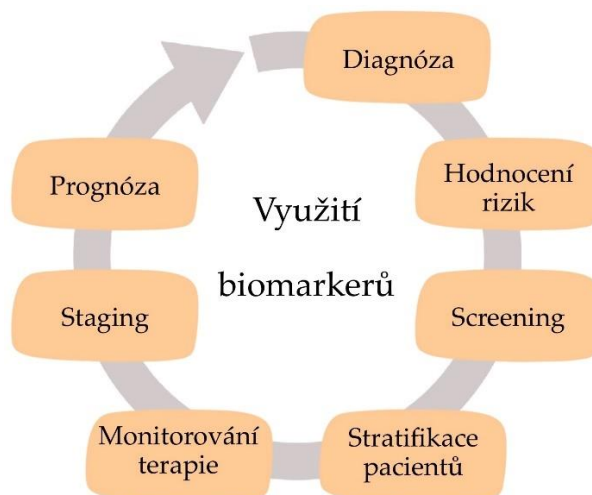
Nádorové markery lze dělit do 5 skupin, na markery buněčných adhezí, proliferální nádorové markery, hormonální nádorové markery, enzymové nádorové markery a na ostatní nádorové markery [66].

Markery buněčných adhezí zajišťují komunikaci v mezitkáňovém prostoru a jsou aktivovány v případě ohrožení buňky škodlivinami. Můžeme je rozdělit na mucinózní, mezi které řadíme CA 19-9, CA 15-3, CA 72-4 a CA 125. Příklady nemucinózních jsou karcinoembryonální antigen (CEA), HE4 protein, S-100 protein a antigen skvamózních nádorových buněk (SCCA). Pro integritu buněk je důležitá síť tvořená z cytokeratinových filament, součástí těchto filament jsou proliferální nádorové markery. Tyto cytokeratiny se dostávají do krevního oběhu, pokud se maligní buňka začne intenzivně dělit. V tento moment se cytokeratiny přeměňují na rozpustné fragmenty pronikající do cirkulace. Klinicky významnými jsou tkáňový polypeptidický antigen (TPA) a cytokeratinový fragment 21-1 (CYFRA 21-1). Hormonální nádorové markery nacházíme u pacientů s tumory endokrinních žláz nebo jsou produkovány tkání, která fyziologicky tyto hormony netvoří. Jako příklad lze uvést hormony placenty, které jsou v organismu detekovatelné pouze během těhotenství, jedná se třeba o lidský choriový gonadotropin (hCG) u bronchogenního karcinomu. Do skupiny enzymových nádorových markerů lze zařadit neuron-specifickou enolázu (NSE), tymidinkinázu (TK) nebo laktátdehydrogenázu (LD). Jako ostatní onkomarkery můžeme zařadit alfa-fetoprotein (AFP) nebo beta-2-mikroglobulin (B2M) [64; 66].

3.10.3 Klinické využití

Konvenčně používané nádorové markery mohou být buď proteiny, nebo glykoproteiny, které se pravděpodobně nepodílejí na karcinogenezi nebo rozvoji nádorového procesu, spíše se jedná o vedlejší produkty maligní transformace. Slibné jsou nízkomolekulární markery nebo markery nukleových kyselin, genové mutace nebo polymorfismy a kvantitativní analýza genové exprese, peptidy, proteiny, metabolity lipidů a další malé molekuly, které jsou v poslední době hodnoceny jako potenciální klinicky užitečné nádorové markery [47].

Byla navržena klasifikace molekul s důrazem na klinickou využitelnost, biomarkery byly rozděleny na predikční biomarkery – biomolekuly DNA, detekční biomarkery – molekuly RNA, diagnostické biomarkery – proteinové biomarkery a prognostické biomarkery – glykobiomarkery. V klinické praxi mají biomarkery široké uplatnění, které zahrnuje screening, časnou detekci, diagnostické potvrzení onemocnění, prognózu, predikci léčebné odpovědi, monitorování a recidivu onemocnění (Obrázek 4) [47].



Obrázek 4 – Klinické využití biomarkerů [47; upraveno]

Další využití zahrnuje monitoring markerů, které mají souvislost s náchylností k rakovině a dochází k hodnocení rizika. Jsou vyhledávány osoby s vysokým

rizikem vzniku rakoviny nebo kandidáti pro screeningové programy a včasné preventivní studie. Mezi markery hodnocení rizika nebo náchylnosti patří markery zánětu, oxidačního stresu, jednonukleotidových polymorfismů a mutací v určitých genech [47].

3.10.4 Karcinoembryonální antigen

Karcinoembryonální antigen (CEA) je řazen mezi onkofetální antigeny a je jedním z důležitých nádorových markerů v klinické praxi. Jedná se o nemucinózní glykoprotein zapojený do buněčných adhezí, který zajišťuje adhezi mezi epiteliálními buňkami tlustého střeva a kolagenem. Je přítomen na endoluminální straně buněčné membrány normálních buněk a předpokládá se, že inhibuje apoptózu a podílí se na patogenezi nádorů. Molekulová hmotnost se pohybuje kolem 200 kDa [46; 66; 68].

Tento antigen patří mezi nejpoužívanější nádorové biomarkery a je prognostickým ukazatelem v klinických testech, v onkologické praxi je brán jako užitečný a nákladově efektivní nástroj pro sledování a hodnocení průběhu onemocnění. CEA je stabilní molekula, která se nejčastěji stanovuje v krvi (plazmě), příležitostně ho lze stanovit i v jiných tělesných tekutinách, z pleurální tekutiny, peritoneální tekutiny nebo vzácně z mozkomíšního moku. CEA se nachází v tkáni trávicího traktu plodu. V krvi zdravých dospělých osob by měly být hodnoty minimální, zatímco abnormální hladina CEA může být známkou nádorového onemocnění. Hladina CEA měřená před operací a po ní indikuje úspěšnost chirurgického zákroku a prognózu pacientova uzdravení. Hladina CEA může být měřena také během chemoterapie, aby bylo možné vyhodnotit průběh a výsledek léčby [46; 66; 68; 69].

CEA je nespecifický sérový biomarker, který je zvýšený u různých malignit, jako je kolorektální karcinom, mucinózní karcinom vaječníků, karcinom prsu, dělohy, jater, žaludku, bronchů a medulární karcinom štítné žlázy. Je to

nádorově asociovaný antigen, jenž byl poprvé izolován z buněk karcinomu tlustého střeva Goldem a Freedmanem v roce 1965. Poté byl nalezen v různých dalších tumorových buňkách plic, ledvin, žaludku, pankreatu, jícnu, žlučových cest, děložního čípku a prostaty. Vzhledem k tomu, že je spojen s různými typy maligních i nemaligních onemocnění, není zvýšená hladina CEA v séru definitivním markerem konkrétního místa vzniku nádorového onemocnění. Výzkum ukázal, že obsah CEA koreluje se závažností onemocnění [46; 64; 67; 68; 69; 70; 71; 72].

Referenční hodnota se pohybuje do 5 ng/ml, hodnoty vyšší jsou považovány za patologické. Pokud je u pacientů koncentrace abnormálně zvýšená (pětinásobně i více oproti horní referenční hodnotě) je velká pravděpodobnost výskytu tumoru v organismu. Některá benigní onemocnění mohou také zvyšovat CEA, jedná se o jaterní choroby, Crohnovu chorobu, onemocnění ledvin, plic, žlučových cest a žlučníku a pankreatitidy. Kouření minimálně zdvojnásobuje normální koncentraci CEA, běžná hodnota je 10 ng/ml. Hladiny koncentrací CEA jsou uvedeny v Tabulce 1 [65; 69; 71].

Tabulka 1 – Hladiny koncentrací CEA

	Koncentrace [ng/ml]	Prediktivní onemocnění
Referenční hodnota	≤ 5	X
Hraniční hodnota	5–25	Benigní onemocnění, progrese maligního procesu, kuřáci
Abnormální hodnota	≥ 25	Velká pravděpodobnost výskytu tumoru v organismu

CEA je základní marker při sledování kolorektálního karcinomu (CRC), který je třetím nejčastějším zhoubným nádorem na světě, CRC představuje vážnou hrozbu vzhledem k jeho vysoké morbiditě a mortalitě. Současná doporučení, Americkou společností klinické onkologie (ASCO), jsou rutinně provádět vyšetření CEA v tříměsíčních intervalech během pooperačního sledování a v jednoměsíčních až tříměsíčních intervalech během systémové léčby metastazujícího CRC. Vysoká produkce CEA nádory je spojena se zvýšeným růstem nádoru a horší prognózou. Hladiny CEA se výrazně zvyšují u dobře diferencovaného kolorektálního karcinomu [66; 67; 69].

3.10.5 Detekce CEA

Metod pro kvantitativní stanovení CEA existuje opravdu mnoho, patří mezi ně fluorometrická analýza, imunoanalýza s povrchovým Ramanovým rozptylem, elektrochemická, fotoelektrochemická, fluorescenční a chemiluminiscenční imunoanalýza, které jsou citlivé a specifické. Z nich si elektrochemické a optické imunosenzory v poslední době získávají stále větší oblibu při kvantitativní detekci CEA díky nízkým nákladům, rychlé odezvě, snadné manipulaci a miniaturizaci [46].

Efektivní detekce CEA je předmětem mnoha studií. Byl navržen imunosenzor sendvičového typu pro stanovení CEA. Pro připojení primární protilátky byly použity zlaté nanočástice, díky své elektrické vodivosti a biokompatibilitě. Jako nosič iontů olova a druhé protilátky byl použit nanohybrid disulfidu molybdeničitého a oxidu ceričitého ($\text{CeO}_2\text{-MoS}_2$). Elektrochemický imunosenzor měřil elektrický signál Pb^{2+} . Nanosonda byla použita k detekci antigenu CEA v séru, kdy byl elektrický signál úměrný koncentraci. Detekční rozsah byl 0,001–80 ng/ml a minimální detekční limit 0,3 pg/ml, selektivita, specifičnost a reprodukovatelnost byly také dobré [43].

Pro detekci CEA byl zkonstruován chemiluminiscenční (CL) aptasenzor založený na CL systému luminol-H₂O₂-NaOH. Magnetické uhlíkové nanotrubičky použité jako nosič byly modifikovány CEA-aptamérem a DNA1, dále byly kombinovány s Ag@ZIF-67, který byl modifikován DNA2, k interakci došlo prostřednictvím komplementárního párování bází. Aptamer je jednořetězcový oligonukleotid vyrobený metodou obohacování ligandu. CEA se specificky vázal s aptasenzorem, pokud byl přítomen v roztoku. CL senzor prokázal vysokou selektivitu a citlivost pro CEA ve vzorku lidského séra, kdy detekční limit byl 4,53 pg/ml v případě, že detekční rozsah byl 0,05–500 ng/ml [73].

Pro detekci CEA byla vyvinuta jednoduchá a citlivá elektrochemická imunoanalytická elektroda. Protilátka proti CEA byla kovalentně navázána na monovrstvu glutathionu modifikovanou zlatou nanočásticí (AuNP) a výsledný biokonjugát byl imobilizován na Au elektrodu elektrokopolymerací s o-aminofenolem. Takto byla získána jednoduchá a citlivá neznačená elektrochemická imunoanalytická elektroda, pomocí které bylo možné stanovit CEA s detekčním limitem 0,1 ng/ml v rozsahu 0,5–20 ng/ml [74].

Tyto studie prokázaly, že imunosenzory mají dobrou výpovědní hodnotu při detekci screeningu lidských nádorových markerů a navrhované metody mají velký potenciál pro diagnostiku rakoviny. Díky včasné detekci lze dosáhnout lepších výsledků léčby [43; 46; 73].

3.11 Vybrané metody detekce bílkovin

3.11.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je technika spektroskopie, která zachycuje vibrační energii molekulárních vazeb. Vibrace se vytvářejí díky dopadajícímu infračervenému záření. Vzniklé spektrum biologického vzorku se běžně označuje jako otisk prstu, protože poskytuje

jedinečný spektrální podpis vzorku a umožňuje identifikaci a kvantifikaci organických funkčních skupin. Výhodnou vlastností technik založených na infračerveném záření je, že se řídí principy Lambert-Beerova zákona, což umožňuje kvantifikaci vzhledem k absorbanci světla ve vzorku, kterým prochází. Koncentraci bílkovin lze stanovit, jelikož podíl světla absorbovaného vzorkem bude korelovat s koncentrací molekul ve vzorku [75; 76; 77; 78].

3.11.2 Biuretová reakce

Ke stanovení celkové bílkoviny se obvykle používá biuretová metoda. Je to klasická kolorimetrická metoda, která je rychlá a jednoduchá na provedení. Dalšími výhodami jsou vynikající specifita a citlivost [79; 80].

Princip této metody spočívá v tom, že peptidová vazba aminokyselinových zbytků a dvou měďnatých iontů (Cu^{2+}) v alkalickém prostředí vytvoří fialový komplex. Sytost fialové barvy je pak přímo úměrná koncentraci bílkovin ve vzorku (detekce peptidových vazeb), která se stanovuje fotometricky při 540 nm [79; 80].

4 METODIKA

V této kapitole jsem shrnula metodiku navržení a výroby biosenzoru pro detekci karcinoembryonálního antigenu. Nejprve bylo zapotřebí připravit kvalitní nanovlákná a provést funkcionalizaci (imobilizaci protilátky na jejich povrch).

V laboratoři jsem připravila pufovaný fyziologický roztok, který simuloval umělou plazmu. Do pufru jsem přidala karcinoembryonální antigen v různých koncentracích. Karcinoembryonální antigen ve fosfátovém pufru jsem detekovala pomocí připraveného bionanosenzoru.

Připravený roztok o známé koncentraci antigenu jsem inkubovala s nanovláknou funkcionalizovanými protilátkou.

Nanovlákná jsem přenesla v Petriho miskách na transiluminátor a prosvítla je při 254 nm. Vzhledem k tomu, že je PAN opticky aktivní v dané oblasti vlnových délek, dochází k tomu, že navázané CEA, absorbují v téže oblasti vlnových délek. Díky tomu se snižuje množství excitační energie a následně také emisní energie PAN, zaznamenaná v podobě luminiscence.

Výsledek jsem zdokumentovala. Zeslabení záření by mělo nelineárně odpovídat množství navázané protilátky.

Provedla jsem průkaz peptidové vazby pomocí biuretové reakce. Poté jsem stanovila absorbanci povrchu PAN nanovlákná s navázaným antigenem. Absorbanci jsem změřila pomocí spektrofotometru.

4.1 Výroba biosenzoru pro detekci karcinoembryonálního antigenu

4.1.1 Příprava nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování

Instruktaž o výrobě a vlastnostech nanovláknenných nosičů probíhala v Univerzitním centru energeticky efektivních budov ČVUT (UCEEB). Pod odborným vedením Ing. Anny Novotné jsem v laboratoři pokročilých biomateriálů vyrobila nanovláknna metodou elektrostatického zvlákňování.

Připravila jsem roztok poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL) rozpuštěním 24 g PCL (s molekulovou hmotností 45 000) v 90 ml chloroformu, který jsem smíchala s 10 ml ethanolu.

Nanospider™ (Obrázek 5) NS 1WS500U (Elmarco Company, ČR) jsem připravila pro elektrostatické zvlákňování. Do stroje jsem umístila netkanou spunbond textilií, na kterou jsem označila start.

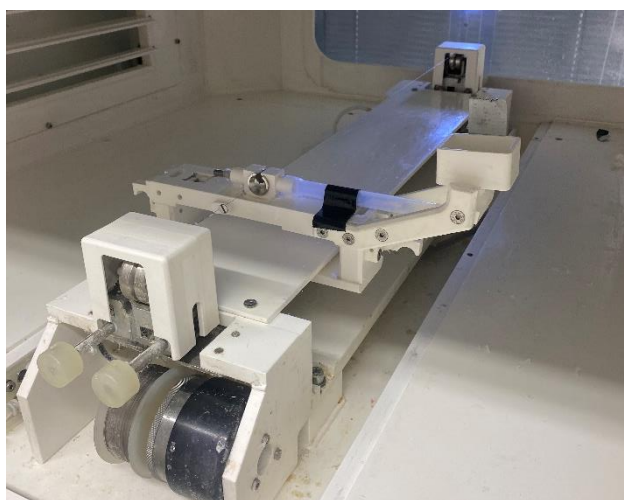


Obrázek 5 – Nanospider™ [vlastní tvorba]

Sestavila jsem jezdec a zásobník naplnila polymerem (Obrázek 6).

Jezdec rovnoměrně nanášel polymer na tenkou strunu, aby docházelo k rovnoměrnému dávkování, musel být polymer homogenní, ideálně zcela bez vzduchových bublin.

Jezdec jsem zaaretovala a přidala jsem závlačku a krycí plech.



Obrázek 6 – Jezdec se zásobníkem na polymer [vlastní tvorba]

Nanospider jsem spustila a nastavila hodnoty pro zvlákňování. Před zvlákňováním jsem zkontrolovala vlhkost vzduchu.

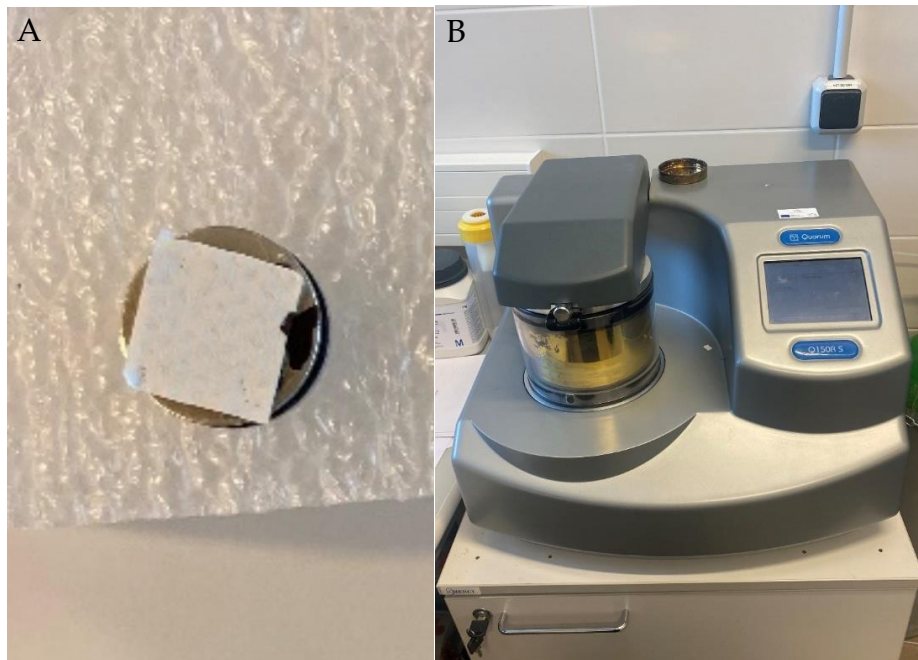
Výroba nanovláken probíhala při proudu 0,14 mA a při napětí 30,1 kV. Spunbond textilie, která se posouvala konstantní rychlostí (15 mm/min), sloužila k zachytávání vytvořených nanovláken.

Jeden cyklus výroby probíhal 20 minut, poté jsem textilii převinula zpět do pozice start, tento proces jsem pětkrát opakovala. Na textilii se vytvořila silnější vrstva nanovláken.

4.1.2 Kontrola nanovláken pomocí SEM mikroskopie

Po ukončení výrobního procesu jsem zkontrolovala kvalitu nanovláken. Vzorek spunbond textilie s vrstvou nanovláken jsem sejmula z Nanospideru, nastříhala a připevnila k oboustranné lepící uhlíkové pásce tak, aby vrstva s nanovláknými byla umístěna směrem vzhůru.

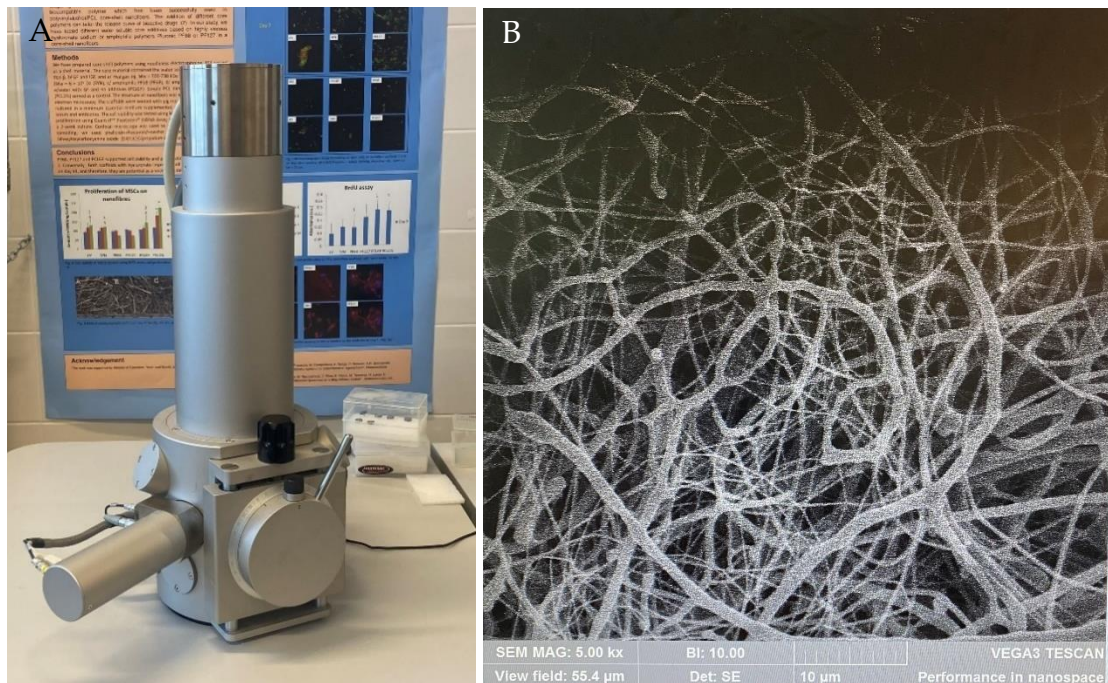
Vzorky odebrané z různých míst textilie jsem připevnila na hliníkové nosiče vzorku typu Pin-Type Mount o průměru 12,7 mm (Obrázek 7 A). Vzorky jsem pozlatila pomocí přístroje Q150R S (Quorum Technologies Ltd., Ringmer, UK) viz Obrázek 7 B.



Obrázek 7 – A) Hliníkové nosiče vzorku s připevněnými nanovláknými, B) Přístroj Q150R S, sloužící k pozlacení vrstvy nanovláken [vlastní tvorba]

Po pozlacení jsem kvalitu nanovláken pozorovala a vyhodnotila pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Typ elektronového mikroskopu byl VEGA 3 TESCAN (Obrázek 8 A).

Při kontrole nanovláken jsem kladla důraz na homogenitu průměru vláken, plošnou hmotnost, hustotu, prostorové uspořádání a kvalitu vláken (hladký povrch bez kuliček) viz Obrázek 8 B.



Obrázek 8 – A) Rastrovací elektronový mikroskop (SEM) VEGA 3 TESCAN,
B) Kontrola kvality nanovláken [vlastní tvorba]

4.1.3 Parametry výrobního procesu nanovláken

Výrobu nanovláken jsem demonstrovala na polymeru PCL. K výrobě biosenzoru jsem však použila polyakrylonitrilová (PAN) nanovlákná, která se rozpouštěla v tvrdších rozpouštědlech. Jelikož by mohlo dojít k poškození některých plastových částí Nanospideru a zároveň je velmi náročné následné čištění stroje po zvlákňování PAN nanovláken, byla tato nanovlákná vyrobena firmou SINDAT podle následujících parametrů.

Prášek polyakrylonitrilu (PAN) (Sigma Aldrich) byl rozpuštěn v N,N-dimethylformamidu (DMF) a míchán po dobu 2 h na magnetickém míchadle při 35 °C. Proces elektrostatického zvlákňování (electrospinningu) byl

proveden na laboratorním přístroji Nanospider NS 1WS500U (Elmarco Company, ČR). Jako zvlákňovací elektroda byl využit drát z oceli o průměru 0,2 mm. Vzdálenost mezi elektrodami byla nastavena na 20 a 25 cm a potenciálový rozdíl byl v rozsahu od 50 kV do 90 kV. Nanovlákná byla sbírána na polypropylenové (PP) netkané spunbondové textilii. Výroba byla prováděna při laboratorní teplotě (20 °C) a relativní vlhkosti vzduchu 20 %. Po procesu electrospinningu byla nanovlákná uchována na vzduchu při laboratorní teplotě.

4.1.4 Redukce nanovláken

Nanovlákná byla modifikována ve dvou krocích. Prvním byla redukce, následovala funkcionalizace.

Redukce byla provedena na pracovišti Draslovka a.s. Kolín, jelikož se jedná o velmi nebezpečnou reakci, při které přítomnost i stopového množství vlhkosti způsobí výbuch.

Redukovaná nanovlákná byla transportována v atmosféře dusíku a uzávěr byl utěsněn parafilmem.

4.1.5 Funkcionalizace nanovláken protilátkami a určení jejich koncentrace metodou FTIR

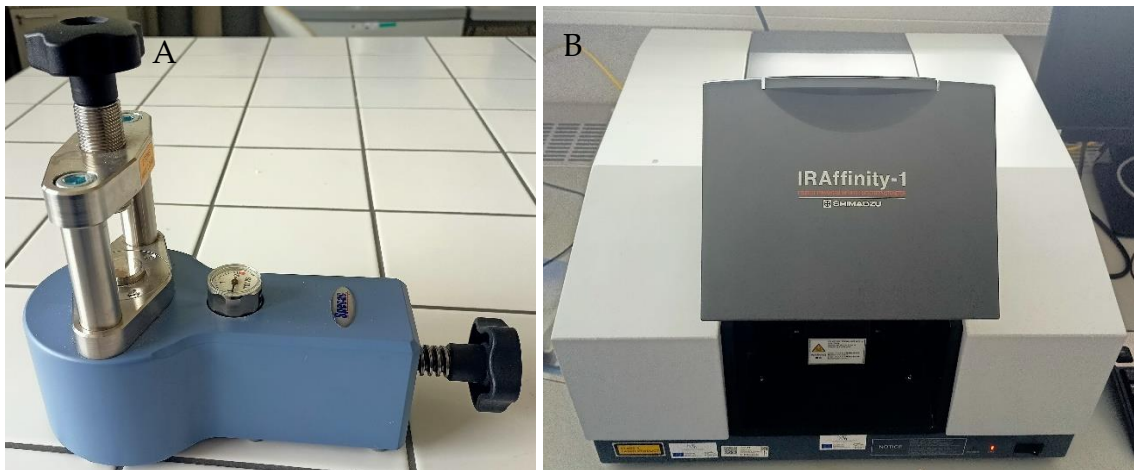
Přesný postup funkcionalizace nanovláken je předmětem patentového řízení.

Vlastní funkcionalizaci prováděla firma NanoProgress, s.r.o. Kovalentní vazbou byly navázány anti-CEA protilátky (Sigma-Aldrich, Rabbit monoclonal, clone RM326, USA) na povrch modifikovaných PAN nanovláken.

Přibližná koncentrace anti-CEA protilátek na povrchu PANových nanovláken byla $112 \pm 8 \mu\text{M/g}$. Koncentrace bílkovin (protilátek) byla zjištěna pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

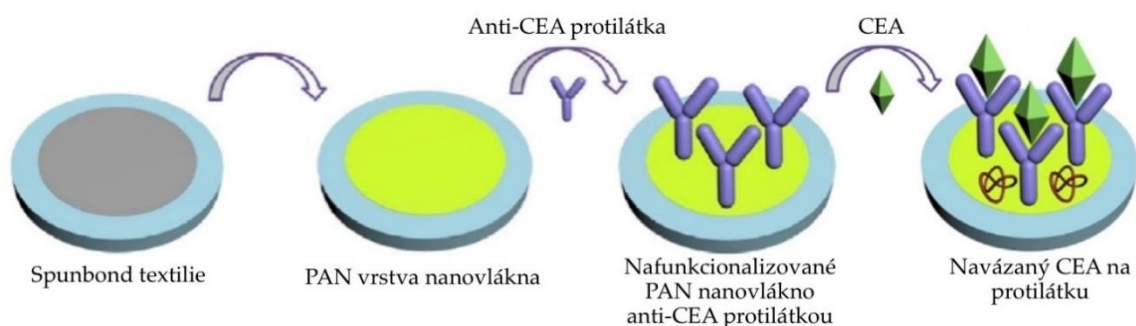
Před samotným měřením koncentrace je třeba vzorek homogenizovat. Homogenizace se provádí ve vibračním mlýnku. Vzorek se následně přemístí do speciální evakuační formy v lisu. Lis je zobrazen na Obrázku 9 A, vzorek se v něm homogenizuje vysokým tlakem.

FTIR spektrofotometr (Shimadzu, Japonsko) je zobrazen na Obrázku 9 B.



Obrázek 9 – A) Lis pro homogenizaci vzorku, B) FTIR spektrofotometr
[vlastní tvorba]

Na Obrázku 10 je schéma vyrobeného bionanosenzoru pro detekci karcinoembryonálního antigenu.



Obrázek 10 – Schéma vyrobeného bionanosenzoru pro detekci CEA
[43; upraveno]

Funkcionalizovaná nanovlákna jsem uchovávala v pufru s přidavkem azidu sodného (<0,01 %), který se musí před používáním řádně vymýt.

4.1.6 Příprava potřebných roztoků

1x koncentrovaný PBS s Tweenem 20 (0,1 %)

Roztok byl smíchán v poměru 20 : 1. Do kádinky jsem nalila 20 ml 10x koncentrovaného PBS se 180 ml destilované vody a poté přidala 200 µl Tweenu 20. Experiment probíhal ve fosfátovém pufrovaném fyziologickém roztoku.

Biuretové činidlo

Roztok jsem připravila odvážením na váze (Kern EMB 2000-2) 0,3 g pentahydrátu síranu draselného ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($M = 249,68$)), 1,2 g tetrahydrátu vinanu sodnodraselného ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ($M = 282,23$)), 6 g hydroxidu sodného (NaOH ($M = 39,997$)) a smícháním s 200 ml destilované vody.

Kalibrační řada antigenu CEA

Smíchala jsem 8 ml roztoku (1x koncentrovaný PBS a Tween 20) s 2 µl antigenu CEA (Sigma-Aldrich, Source SLCL6136, USA). Vznikl roztok o koncentraci 250 ng/ml, poté jsem roztok 10x naředila 1x koncentrovaným PBS s Tweenem 20. Roztok o konečné koncentraci 25 ng/ml jsem homogenizovala na vortexu (Velp Scientifica, ZXClassic). Z tohoto roztoku jsem následně připravila kalibrační řadu.

Do zkuševky 1 jsem dala kontrolu – 1x koncentrovaný PBS s Tweenem 20. Roztok antigenu o koncentraci 25 ng/ml jsem 2x naředila kontrolou a promíchala na vortexu. Vzniklý roztok jsem dále naředila 4x na koncentraci 3,125 ng/ml a opět promíchala. Připravila jsem kalibrační řadu antigenu CEA o koncentracích

25 ng/ml, 12,5 ng/ml a 3,125 ng/ml. Jako kontrolu jsem použila 1x koncentrovaný PBS s Tweenem 20.

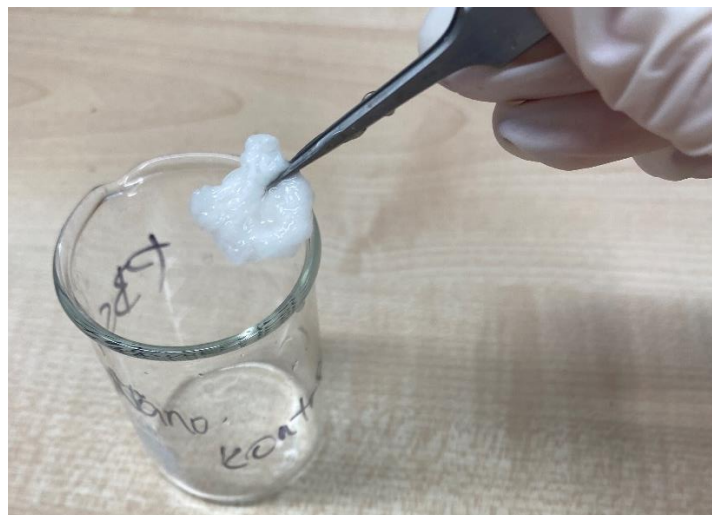
Druhá kalibrační řada vznikla ředěním roztoku o koncentraci 25 ng/ml. Roztok byl naředěn 10x, 100x a 1000x.

4.1.7 Detekce CEA

Z lednice jsem vyndala nanovlákná, která byla uchována v pufru PBS s přídatkem azidu sodného. Nanovlákná jsem pomocí pinzety vyjmula z pufru s přídatkem azidu sodného a důkladně ho promyla (Obrázek 11).

K jednomu kusu odděleného nanovlákná jsem do kádinky nanesla pipetou 5 ml PBS (promývací roztok), obsah kádinky jsem promíchala na vortexu.

Roztok PBS jsem slila do odpadní kádinky tak, aby nanovlákná zůstalo v kádince. Proplach jsem 3x opakovala.

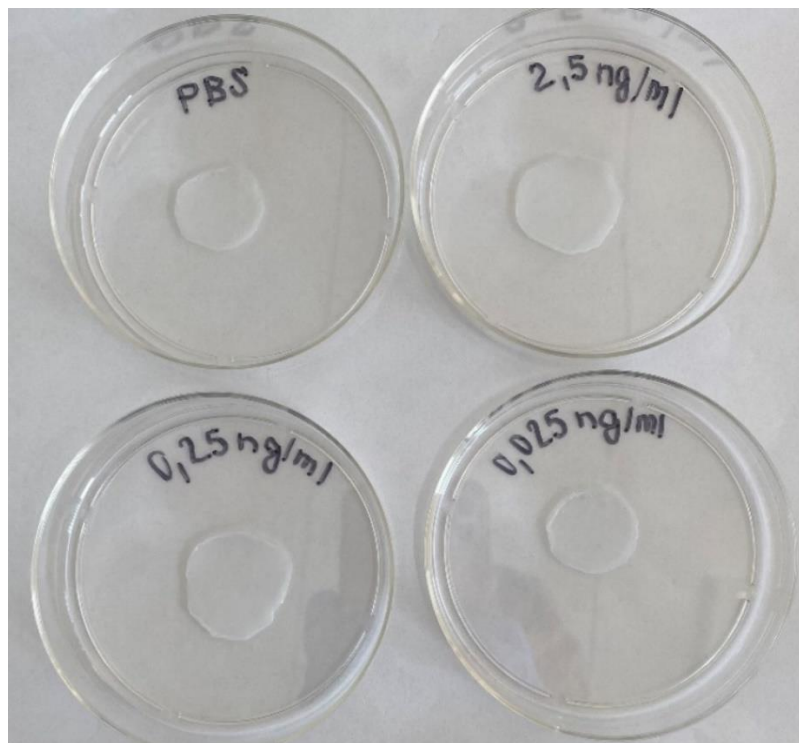


Obrázek 11 – Manipulace s nanovláknem pomocí pinzety [vlastní tvorba]

Jeden kus nanovlákná s navázanou anti-CEA protilátkou jsem přidala do předem připravených a označených kádinek s 5 mililitry roztoku kalibrační řady o koncentracích CEA antigenu:

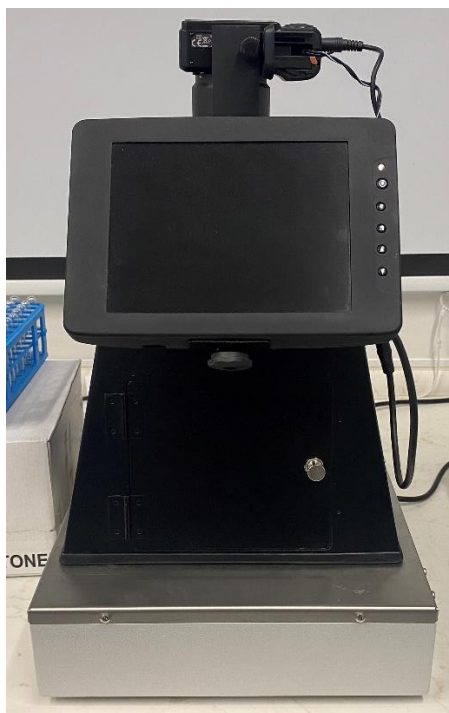
1. 0 ng/ml v kádince byl jen PBS (kontrola);
2. 25 ng/ml;
3. 12,5 ng/ml;
4. 3,125 ng/ml.

Následně jsem všechny kádinky homogenizovala na vortexu, aby došlo k navázaní antigenu na protilátku. Inkubovala jsem 30 min při laboratorní teplotě, každých 10 min inkubace jsem kádinky promíchala na vortexu. Provedla jsem 2x proplach 5 ml PBS. Nanovlákná jsem pomocí pinzety přenesla na předem označené Petriho misky. Nanovlákná jsem opatrně rozprostřela pomocí pinzety a preparační jehly (Obrázek 12).



Obrázek 12 – Rozprostřená nanovlákná na Petriho miskách [vlastní tvorba]

Nanovlákná v Petriho miskách jsem přenesla na transiluminátor (Biostep GmbH USTD-20SM-8K) s fotodokumentací (Cleaver Scientific microDOC) a prosvítila při vlnové délce 254 nm. Transiluminátor s fotodokumentací je zobrazen na Obrázku 13. Fotoaparát jsem nastavila a výsledky jsem zdokumentovala. Jako ideální se ukázalo nastavení fotoaparátu na ISO 3200.



Obrázek 13 – Transiluminátor s fotodokumentací [vlastní tvorba]

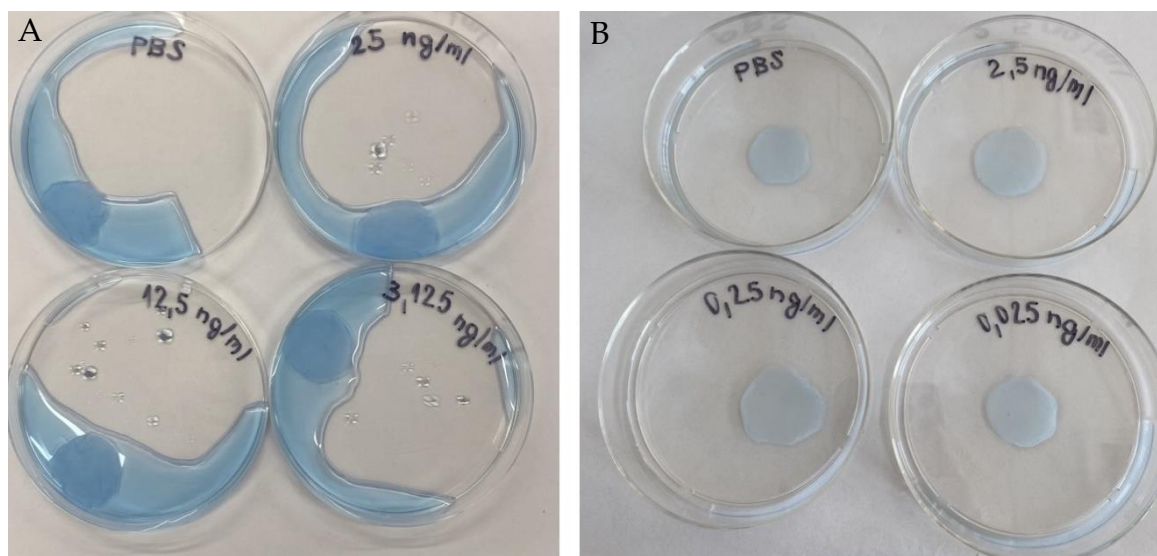
Poté jsem nanovlákná vložila zpátky do předem popsaných uzavíratelných zkumavek s 5 ml PBS a uchovala v lednici do dalšího měření. Postup byl totožný i v případě druhé kalibrační řady, kde jsem použila roztoky o koncentracích CEA antigenu:

1. 0 ng/ml v kádince byl jen PBS (kontrola);
2. 2,5 ng/ml;
3. 0,25 ng/ml;
4. 0,025 ng/ml.

4.1.8 Měření absorbance

Do Petriho misky jsem rozprostřela nanovláknno a přidala 5 ml biuretového činidla (Obrázek 14 A).

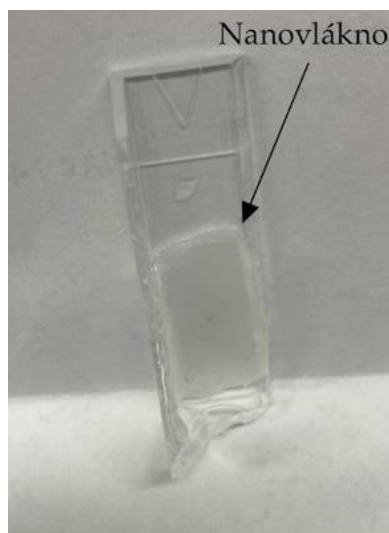
Nechala jsem reagovat 20 minut při laboratorní teplotě. Slila jsem biuretové činidlo do odpadní kádinky a nanovláknna dvakrát promyla 5 ml destilované vody. Promytá nanovláknna jsem rozprostřela na Petriho miskách (Obrázek 14 B).



Obrázek 14 – A) Nanovláknna po přidání biuretového činidla, B) Nanovláknna po promytí [vlastní tvorba]

K fotometrickému stanovení bylo třeba rozpůlit kyvetu, tak vznikl hranol s trojúhelníkovou podstavou.

Nanovlákná jsem pečlivě a v jedné vrstvě napnula na kyvetu (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Rozpůlená kyveta s napnutým nanovláknem [vlastní tvorba]

Absorbanci nanovláken jsem proměřila na UV-VIS-NIR spektrofotometru viz Obrázek 16 (Shimadzu UV-3600, Japonsko) a následně jsem výsledky zhodnotila.

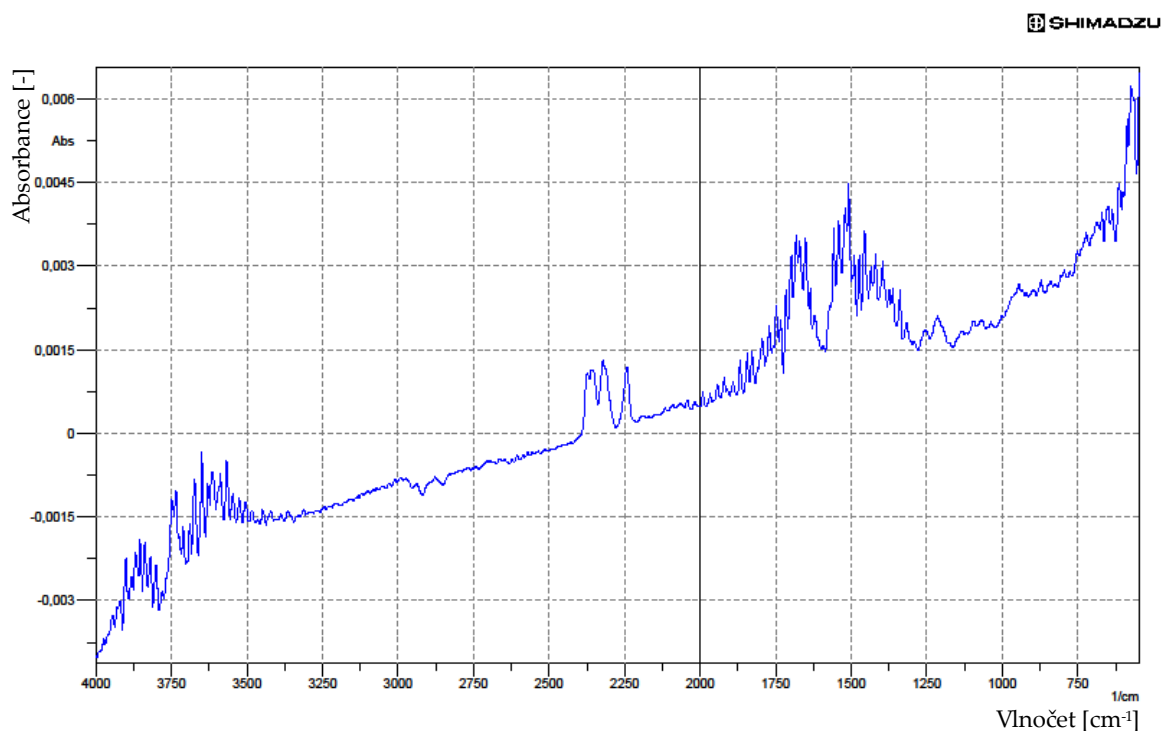


Obrázek 16 – UV-VIS-NIR spektrofotometr Shimadzu UV-3600 [vlastní tvorba]

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledná spektra FTIR

Spektra byla získána pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. FTIR spektrofotometr automaticky přepočítal FTIR spektrum na hodnoty absorbancí. Na Obrázku 17 je zobrazené spektrum PAN nanovlákná před funkcionalizací, tudíž bez navázané protilátky anti-CEA. Spektrum na Obrázku 18 znázorňuje PAN nanovlákná s navázanou bílkovinou, kterou je protilátka anti-CEA. Vyznačený pík je důkazem peptidové vazby v analyzovaném vzorku.



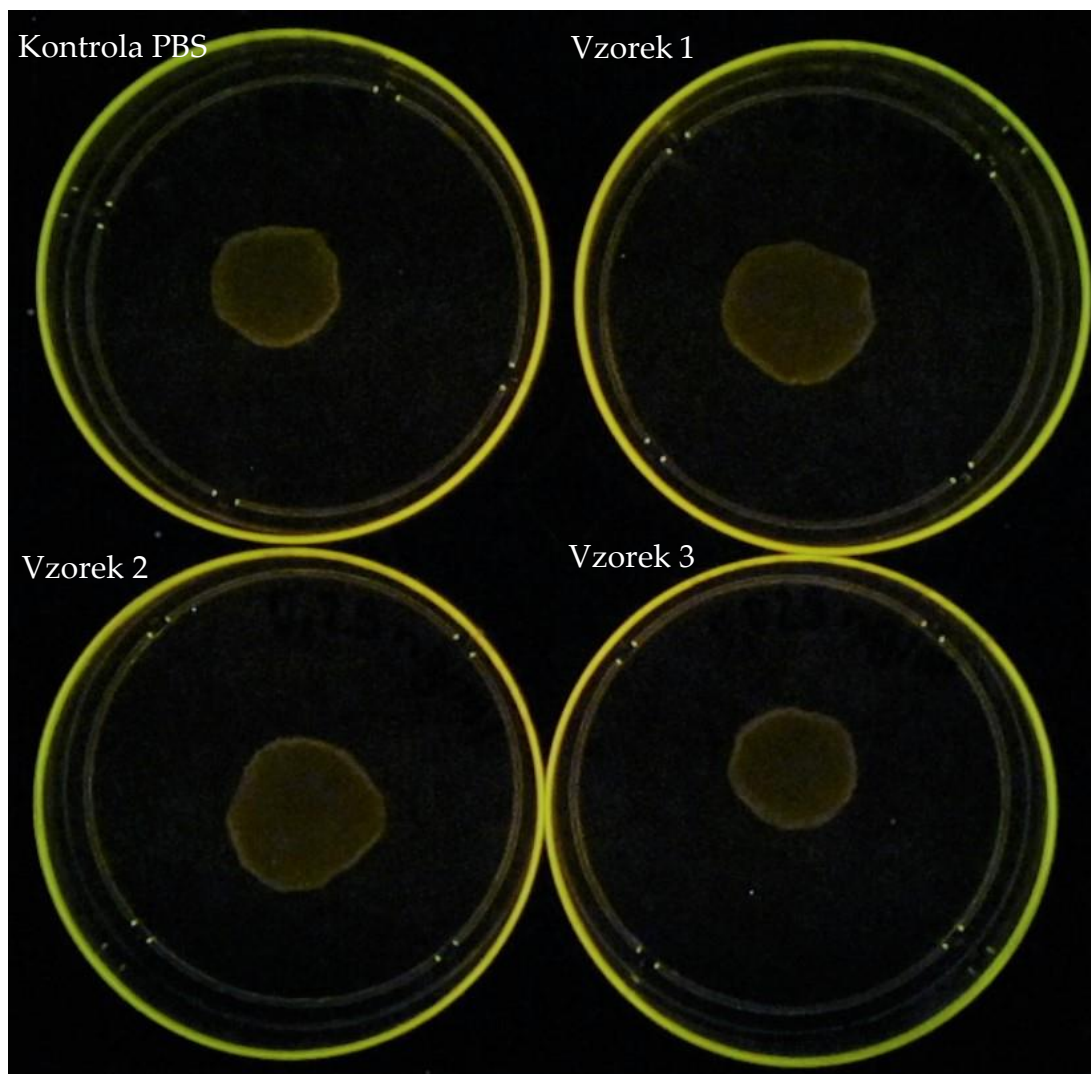
Obrázek 17 – FTIR spektrum PAN nanovlákná bez protilátky [vlastní tvorba]



Obrázek 18 – FTIR spektrum PAN nanovláken s protilátkou [vlastní tvorba]

5.2 Výsledná intenzita PAN nanovláken

Intenzitu světla jsem stanovila z fotografií pořízených na transiluminátoru s fotodokumentací. Nanovlákná jsem prosvítala při vlnové délce 254 nm. Na Obrázku 19 jsem zdokumentovala nanovlákná na transiluminátoru.



Obrázek 19 – Nanovlákná na transiluminátoru při 254 nm [vlastní tvorba]

Obrázek byl nejprve zkonvertován do černobílé, čímž se sečetly všechny RGB barvy do jedné hodnoty. Následně se změřila hodnota intenzity bílé barvy z pořízených fotografií. Úprava fotografií byla provedena v softwaru FIJI.

V Tabulce 2 a 3 jsou uvedeny naměřené intenzity PAN nanovláken, které byly inkubovány v kalibrační řadě od 3,125 ng/ml do 25 ng/ml CEA. Data PAN nanovláken po inkubaci v řadě kalibrační řadě CEA jsou zaznamenána v Tabulce 4.

Tabulka 2 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v kalibrační řadě CEA

Označení vzorku	Koncentrace CEA [ng/ml]	Výsledná intenzita
Kontrola PBS	0	14,879
Vzorek 3	3,125	12,784
Vzorek 2	12,5	11,794
Vzorek 1	25	11,625

Tabulka 3 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v kalibrační řadě CEA

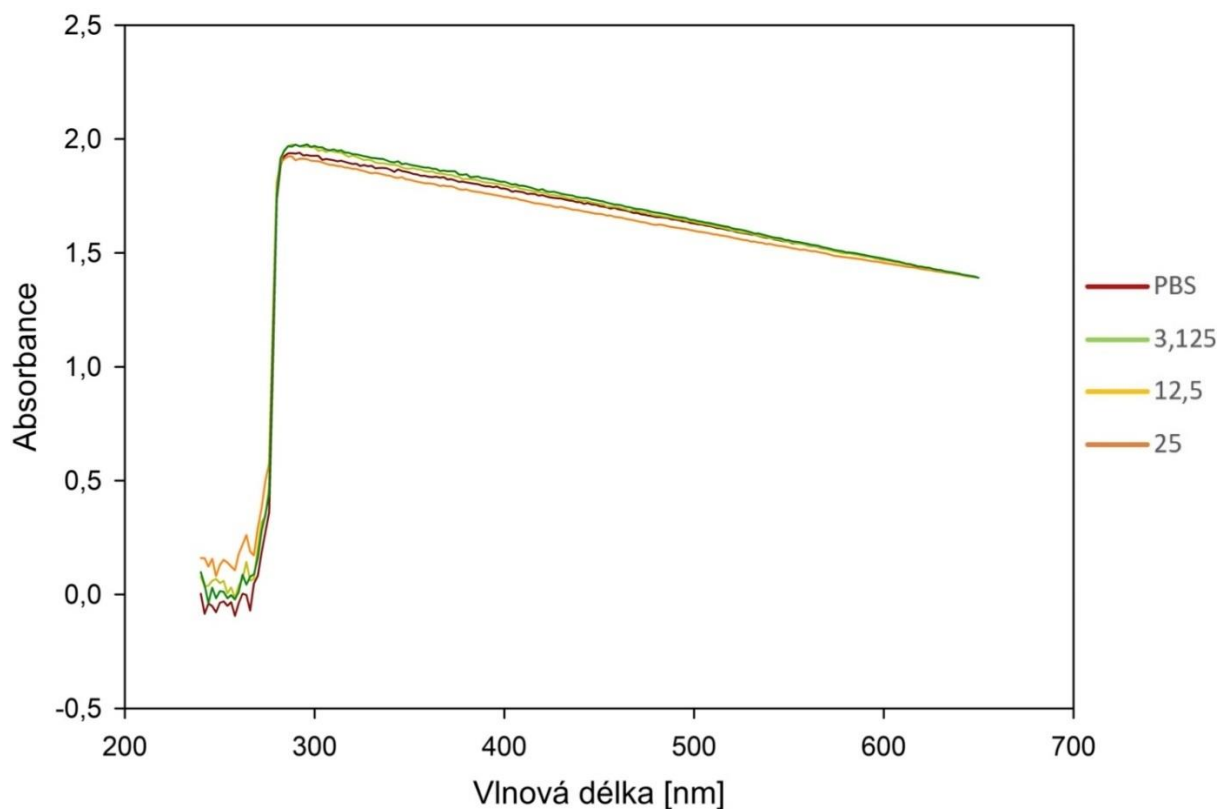
Označení vzorku	Koncentrace CEA [ng/ml]	Výsledná intenzita
Kontrola PBS	0	35,177
Vzorek 3.1	3,125	29,743
Vzorek 2.1	12,5	28,272
Vzorek 1.1	25	24,087

Tabulka 4 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v ředěné kalibrační řadě CEA

Označení vzorku	Koncentrace CEA [ng/ml]	Výsledná intenzita
Kontrola PBS	0	20,705
Vzorek 3	0,025	20,519
Vzorek 2	0,25	20,260
Vzorek 1	2,5	19,798

5.3 Výsledná absorbance PAN nanovláken

Na Obrázku 20 jsou vyobrazena absorpční spektra PAN nanovláken s navázaným CAE. Absorbance byla měřena při vlnové délce od 240 nm do 650 nm.



Obrázek 20 – Absorpční spektra PAN nanovláken s navázaným CAE
[vlastní tvorba]

Absorbance PAN nanovláken byla změřena na UV-VIS-NIR spektrofotometru při vlnové délce 280 nm. V Tabulce 5 jsou uvedeny naměřené hodnoty absorbancí kalibrační řady od 3,125 ng/ml do 25 ng/ml CEA. Absorbance nanovláken inkubovaných v ředěné kalibrační řadě CEA jsou zaznamenány v Tabulce 6.

Tabulka 5 – Absorbance PAN nanovláken 1. šarže po inkubaci v kalibrační řadě CEA

Označení vzorku	Koncentrace CEA [ng/ml]	Absorbance [-]
Kontrola PBS	0	1,700
Vzorek 3	3,125	1,736
Vzorek 2	12,5	1,750
Vzorek 1	25	1,809

Tabulka 6 – Absorbance PAN nanovláken 2. šarže po inkubaci v ředěné kalibrační řadě CEA

Označení vzorku	Koncentrace CEA [ng/ml]	Absorbance [-]
Kontrola PBS	0	0
Vzorek 3	0,025	0,012
Vzorek 2	0,25	0,053
Vzorek 1	2,5	0,262

6 DISKUZE

Navržený biosenzor byl využit k in vitro imobilizaci karcinoembryonálního antigenu v tekutinách. Výroba bionanosenzoru zahrnovala přípravu kvalitních PAN nanovláken a následnou modifikaci jejich povrchu, která probíhala ve dvou krocích. Nanovláknina musela být nejprve redukována, poté proběhla funkcionalizace, při které byly na jejich povrch navázány protilátky anti-CEA.

Pomocí FTIR spektroskopie byla dokázána úspěšná imobilizace anti-CEA protilátek na PAN vrstvu nanosenzoru (bioreceptor). Na Obrázku 18 je zvýrazněn pík, který je důkazem peptidové vazby ve vzorku. Tato vazba vznikla mezi povrchem PAN nanovláknina a anti-CEA protilátkou.

Kalibrační řada byla zvolena na základě znalosti referenční hodnoty, která je 5 ng/ml. Vzorek 1 obsahoval fyziologickou koncentraci CEA, která byla zvolena 3,125 ng/ml. Na koncentraci má vliv kouření, které hodnotu zvyšuje minimálně dvakrát, proto byla koncentrace dalšího vzorku CEA 10 ng/ml. Velmi vysoká hodnota (pětinásobně zvýšená) znamená velkou pravděpodobnost přítomnosti nádoru v organismu. Z toho důvodu byla koncentrace 3. vzorku 25 ng/ml.

Druhá kalibrační řada vznikla ředěním 3. vzorku, který byl ředěn desetkrát, stokrát a tisíckrát. Tato kalibrační řada měla dokázat schopnost biosenzoru detekovat i velmi nízké koncentrace antigenu v tekutině.

Rozmezí koncentrace CEA, které jsme detekovali ve vzorcích bylo 0,025–25 ng/ml. Podobné rozmezí využili autoři článku, „*An aptasensor for carcinoembryonic antigen based on upconversion fluorescence resonance energy transfer*“, kteří navrhli aptasenzor na bázi uhlíkových nanočástic. Senzor detekoval CEA ve vzorcích lidského séra v rozmezí 0,1–40 ng/ml.

Při manipulaci a rozprostírání nanovláken v Petriho misce se hůře pracovalo s nanovláknem, která byla propláchnuta v destilované vodě. Destilovaná voda zvyšovala povrchové napětí. PBS, který byl ve vzorku před promytím, sloužil jako detergent, proto se s nanovláknem snadněji zacházelo.

Na Obrázku 19 je fotografie pořízená z transiluminátoru. Z fotografií z jednotlivých měření byly po úpravách v softwaru FIJI určeny hodnoty intenzit pro PAN nanovláknem s navázaným antigenem. Řádové rozdíly v hodnotách intenzit byly způsobeny rozdílnými parametry fotografií, které byly pořízeny při rozdílných nastaveních fotoaparátu. Nakonec se jako ideální ukázalo nastavení ISO 3200. Fotografie pořízené v dřívějších měření mají z tohoto důvodu odlišné hodnoty intenzit. Opakovat měření nebylo možné, jelikož náklady na výrobu bionanosenzoru jsou poměrně vysoké. Hodnoty intenzit tak nebylo možné vzájemně porovnat napříč měřeními. Porovnat lze pouze hodnoty intenzit stanovených z jedné fotografie, na které jsou parametry totožné.

Bílkoviny (protilátka i antigen) absorbují v UV oblasti. V Tabulce 2 jsou uvedeny výsledné hodnoty intenzit PAN nanovláken. Z výsledků je patrné, že intenzita klesá se stoupající koncentrací CEA. PBS kontrola fluoreskuje nejvíce, jelikož nanovláknem pohltí nejméně UV záření. Naopak vzorek 1, který byl inkubován v koncentraci 25 ng/ml CEA fluoreskuje nejméně, neboť došlo k většímu pohlcení záření. Z Obrázku 19 by tento trend měl být patrný. Z důvodu, že je porovnání pouhým okem velmi subjektivní a rozdíly nejsou markantní, byly fotografie upraveny a intenzity kvantifikovány.

V Tabulce 3 jsou uvedeny intenzity, které byly naměřeny při opakovaném měření. Mezi hodnotami byl pozorován stejný trend, jenž byl již popsán výše. V Tabulce 4 jsou zaznamenány hodnoty intenzit PAN nanovláken, které byly inkubovány v řadě kalibrační řadě CEA. Trend intenzit je opět klesající.

Obecně lze konstatovat, že platí nepřímá úměra mezi intenzitou a koncentrací CEA ve vzorku.

Na Obrázku 20 jsou patrná absorpční spektra PAN nanovláken s navázaným antigenem. Biuretová reakce detekuje peptidové vazby ve vzorku tak, že dojde k vytvoření komplexní sloučeniny s Cu^{2+} , která absorbuje světlo při 540 nm. Z grafu je patrné, že při této vlnové délce došlo k disperzi, jež byla natolik velká, že jsme nebyli schopni detekovat změny absorbance po biuretové reakci. Z tohoto důvodu jsme museli absorbanci stanovit při vlnové délce 280 nm, při níž rovněž absorbují bílkoviny.

Hodnoty absorbancí jsou uvedeny v Tabulce 5 a 6. Výsledky ukazují, že absorbance stoupá s rostoucí koncentrací CEA, tento trend můžeme pozorovat v obou kalibračních řadách. U měření při vlnové délce 280 nm bylo třeba úplně eliminovat disperzi, což jsme provedli posunutím celých spekter tak, aby jejich absorbance při 650 nm byly stejné. Absorbance různých kalibračních řad nebylo možné vzájemně porovnat, jelikož nanovláknata pocházela z jiné výrobní šarže. Hodnoty intenzit, které byly získány z fotografií, korelují s hodnotami absorbancí změřenými na spektrofotometru.

Nejnižší námi stanovená koncentrace CEA byla 0,025 ng/ml. Vzhledem k tomu, že jsme měli omezené množství nanovláken, nižší hodnoty nebylo možné stanovit. Navazující výzkum by mohl být zaměřen na určení meze detekce bionanosenzoru.

Nanovláknata jsou velmi citlivá díky jejich velkému povrchu. Bylo zjištěno, že jsou vhodná ke spolehlivé detekci antigenu. V našem případě stačilo proměřit pouze nanovláknata makroskopicky odečtem z obrázku nebo vyhodnotit pomocí absorbance. Těmito metodami jsme byli schopni zaznamenat změny v rozsahu koncentrace CEA.

Yang a kol. ve svém článku představili elektrochemický imunosenzor pro detekci CEA, který byl založený na trojrozměrných nanočásticích zlata. Povrch nanokompozitu, který vykazoval dobrou stabilitu, biokompatibilitu a vodivost, sloužil jako matrice pro imunosenzor. Autoři uvádí, že mez detekce byla 0,01 ng/ml s rozsahem stanovení 0,05–40 ng/ml CEA [81].

Autoři článku „*A robust electrochemical immunosensor based on core-shell nanostructured silica-coated silver for cancer (carcinoembryonic-antigen-CEA) diagnosis*“ z roku 2021 navrhli imunosenzor na bázi stříbrných nanočástic, které pokryli oxidem křemičitým. Došli k závěru, že lineární rozsah detekce byl 0,5 až 10 ng/ml s mezí detekce 0,01 ng/ml.

Pro včasnou diagnostiku a monitorování vývoje nádorového onemocnění je v praxi zapotřebí stanovit obvykle více markerů. Další výzkum by se mohl zaměřit na vývoj bionanosenzoru, jenž by dokázal současně detekovat více biomarkerů.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem shrnula poznatky o výrobě a funkcionalizaci nanovláken, biosenzorech a možnostech efektivnější léčby rakoviny prostřednictvím personalizované medicíny. Dále jsem charakterizovala onkomarkery a uvedla jejich klinické využití se zaměřením na karcinoembryonální antigen, který je charakteristický pro některá onkologická onemocnění.

V experimentální části jsem prakticky provedla výrobu nanovlákn. Dále jsem se seznámila s výrobním procesem přípravy biosenzoru na bázi polyakrylonitrilových nanovláken, která byla modifikována ve dvou krocích. Nanovlákn byla funkcionalizována navázáním anti-CEA protilátky. Úspěšnost funkcionalizace jsem ověřila pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací.

Zhotovený bionanosenzor jsem in vitro testovala v kalibračních řadách karcinoembryonálního antigenu, který jsem imobilizovala na bioreceptor. Změřila jsem absorbanci při 280 nm a vyhodnotila úspěšnost navázání. Rozsah detekce antigenu v tekutinách byl 0,025 až 25 ng/ml. V diskuzi jsem porovnala získané výsledky s články, které se rovněž zabývaly detekcí karcinoembryonálního antigenu.

Výsledky ukázaly, že bionanosenzor lze efektivně využít již při detekci velmi nízké koncentrace karcinoembryonálního antigenu v tělních tekutinách. Funkcionalizovaná nanovlákn mají velký potenciál najít uplatnění v oblasti laboratorní imunodiagnostiky při stanovení nádorových onemocnění. Výsledky mohou přispět k dalšímu výzkumu využití senzoru ve screeningových programech a při monitorování léčby, kde jsou přesné detekční metody klíčové.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	Střídavý proud (Altering current)
AFP	Alfa-fetoprotein
ASCO	Americká společnost klinické onkologie
AuNP	Zlatá nanočástice (Au nanoparticle)
B2M	Beta-2-mikroglobulin
CA 125	Carbohydrate antigen
CA 15-3	Carcinoma antigen 15-3
CEA	Karcinoembryonální antigen
CL	Chemiluminiscence
CRC	Kolorektální karcinom
CRP	C-reaktivní protein
CYFRA 21-1	Cytokeratinový fragment 21-1
DC	Stejnoseměrný proud (Direct current)
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
hCG	Lidský choriový gonadotropin
HPMC	Hydroxypropylmethylceluloza
LD	Laktátdehydrogenáza
MSCs	Mezenchymální kmenové buňky
LiAlH ₄	Tetrahydridohlinitan lithný
NSE	Neuron-specifická enoláza
PAA	Kyselina polyakrylová
PAN	Polyakrylonitril
PCL	Poly-ε-kaprolakton
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

PEO	Polyethylenoxid
PHBV	Poly(β -hydroxybutyrát- β -hydroxyvalerátu)
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Poly(kyselina mléčná a glykolová)
PM	Personalizovaná medicína
POCT	Testování v místě péče (Point of care testing)
PSA	Prostatický specifický antigen
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SCCA	Antigen skvamózních nádorových buněk
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop (Scanning electron microscope)
THF	Tetrahydrofuran
TK	Tymidinkináza
TM	Tumorové markery
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy (Tumor necrosis factor)
TPA	Tkáňový polypeptidický antigen
UCEEB	Univerzitní centrum energeticky efektivních budov ČVUT

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HERNÁNDEZ, Sarah Natividad Hernández a Gaurav CHAUHAN. Nanofibers for cancer sensing and diagnostics. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2022, **48**, 66-70 [cit. 2023-03-17]. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.10.164
- [2] LINO, C., S. BARRIAS, R. CHAVES, F. ADEGA, P. MARTINS-LOPES a J.R. FERNANDES. Biosensors as diagnostic tools in clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2022, **1877**(3) [cit. 2023-03-19]. ISSN 0304419X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2022.188726
- [3] HORNE, Jesse, Lauren MCLOUGHLIN, Bailey BRIDGERS a Evan K. WUJCIK. Recent developments in nanofiber-based sensors for disease detection, immunosensing, and monitoring. *Sensors and Actuators Reports* [online]. 2020, **2**(1) [cit. 2023-03-18]. ISSN 26660539. Dostupné z: doi:10.1016/j.snr.2020.100005
- [4] HASSANPOUR, Soodabeh a Mohammad HASANZADEH. Label-free electrochemical-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in the efficient diagnosis of cancer employing electroanalysis and based on point of care (POC). *Microchemical Journal* [online]. 2021, **168** [cit. 2023-03-20]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2021.106424
- [5] PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. [online]. 2009, **103**(12), 1009-1016 [cit.

2022-12-19]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1425>

- [6] *Referátový výběr z anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny.* Sokolská 54, 121 32 Praha 2: Vydává Národní lékařská knihovna, 2018, . ISSN 1212-3048.
- [7] *O nanovlákních: Co jsou to nanovlákná?* [online]. [cit. 2023-04-24]. Dostupné z: <https://www.nafigatepark.cz/o-nanovlaknech/>
- [8] SHI, Shuo, Yifan SI, Yanting HAN et al. Recent Progress in Protective Membranes Fabricated via Electrospinning: Advanced Materials, Biomimetic Structures, and Functional Applications. *Advanced Materials* [online]. 2022, **34**(17) [cit. 2022-11-05]. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.202107938
- [9] NEELAAMBHIGAI, Mayilswamy, Jaya NIRANJANA a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. *Design and fabrication of biodegradable electrospun nanofibers loaded with biocidal agents* [online]. [cit. 2022-11-05]. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2021.2021905
- [10] MIKEŠ, Petr a David LUKÁŠ. *Fyzikální principy tvorby nanovláken I.* Vydání 1. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2015. ISBN 978-80-7494-249-5.
- [11] ZHANG, Ning, Haolin CHEN, Chenjie YANG, Xufang HU, Nianrong SUN a Chunhui DENG. Functionalized nanomaterials in separation and analysis of extracellular vesicles and their contents. *TrAC Trends in*

Analytical Chemistry [online]. 2022, **153** [cit. 2023-03-14]. ISSN 01659936.
Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116652

- [12] WANG, Dandan, Wenxing GU, Weiliang CHEN, Jin ZHOU, Le YU, Byung KOOK KIM, Xuenong ZHANG a Jong SEUNG KIM. Advanced nanovaccines based on engineering nanomaterials for accurately enhanced cancer immunotherapy. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2022, **472** [cit. 2023-03-14]. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2022.214788
- [13] HEYDARI-BAFROOEI, Esmail a Ali A. ENSAFI. Nanomaterials-based biosensing strategies for biomarkers diagnosis, a review. *Biosensors and Bioelectronics: X* [online]. 2023, **13** [cit. 2023-03-14]. ISSN 25901370. Dostupné z: doi:10.1016/j.biosx.2022.100245
- [14] OZOEMENA, Okoroike C., Nsovo S. MATHEBULA, Tobechukwu J. EHIRIM, Tobile MAPHUMULO, Goodness M. VALIKPE, Jerry L. SHAI a Kenneth I. OZOEMENA. Onion-like carbon re-inforced electrospun polyacrylonitrile fibres for ultrasensitive electrochemical immunosensing of *Vibrio cholerae* toxin. *Electrochimica Acta* [online]. 2020, **356** [cit. 2023-03-14]. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2020.136816
- [15] YANG, Xing, Tina HSIA, Andrea MERENDA, Riyadh AL-ATTABI, Ludovic F. DUMEE, San H. THANG a Lingxue KONG. Constructing novel nanofibrous polyacrylonitrile (PAN)-based anion exchange membrane adsorber for protein separation. *Separation and Purification Technology* [online]. 2022, **285** [cit. 2023-03-14]. ISSN 13835866. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2021.120364

- [16] CHAUHAN, Deepika, Pramod K. GUPTA a Pratima R. SOLANKI. Electrochemical immunosensor based on magnetite nanoparticles incorporated electrospun polyacrylonitrile nanofibers for Vitamin-D3 detection. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **93**, 145-156 [cit. 2023-03-14]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.07.036
- [17] ELSADEK, Nehal E., Abdalrazeq NAGAH, Tarek M. IBRAHIM, Hitesh CHOPRA, Ghada A. GHONAIM, Sherif E. EMAM, Simona CAVALU a Mohamed S. ATTIA. Electrospun Nanofibers Revisited: An Update on the Emerging Applications in Nanomedicine. *Materials* [online]. 2022, **15**(5) [cit. 2023-03-14]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma15051934
- [18] ELMARCO. *Elmarco* [online]. In: . [cit. 2022-11-05]. Dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>
- [19] POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRNIK et al. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys* [online]. 2014, **16**(48), 26816-26822 [cit. 2022-11-13]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP04346D
- [20] VALTERA, Jan, Tomas KALOUS, Pavel POKORNY et al. Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2022-11-13]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38557-z
- [21] KENRY a CHWEE TECK LIM. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* [online]. 2017,

- (70), 1-17 [cit. 2022-12-19]. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002>
- [22] SIVAN, M., D. MADHESWARAN, S. HAUZEROVA a V. NOVOTNY. *AC electrospinning: impact of high voltage and solvent on the electrospinnability and productivity of polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds* [online]. 2022, (26) [cit. 2022-12-19]. ISSN 101025. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101025>
- [23] KOVÁŘ, Radovan. *Zvýšení produktivity tvorby anorganických nanovláken* [online]. Liberec [cit. 2022-11-23]. Dostupné z:
http://svoc.tul.cz/svoc_2013/Res/S3.pdf
- [24] KHAN, Zafarulla, Feras KAFIAH, Hafiz Zahid SHAFI, Fayez NUFAIEI, Sarfaraz Ahmed FURQUAN a Asif MATIN. Morphology, Mechanical Properties and Surface Characteristics of Electrospun Polyacrylonitrile (PAN) Nanofiber Mats. *International Journal of Advanced Engineering and Nano Technology (IJAENT)* [online]. 2(3) [cit. 2023-03-02]. ISSN 2347-6389. Dostupné z:
<https://www.researchgate.net/publication/272762247>
- [25] SIVAN, M., D. MADHESWARAN, S. HAUZEROVA et al. AC electrospinning: impact of high voltage and solvent on the electrospinnability and productivity of polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds. *Materials Today Chemistry* [online]. 2022, 26 [cit. 2022-11-13]. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2022.101025

- [26] SHEPA, I., E. MUDRA a J. DUSZA. Electrospinning through the prism of time. *Materials Today Chemistry* [online]. 2021, **21** [cit. 2022-11-17]. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2021.100543
- [27] RYŠÁNEK, Petr, Oldřich BENADA, Jonáš TOKARSKÝ, Michal SYROVÝ, Pavla ČAPKOVÁ a Jaroslav PAVLÍK. Specific structure, morphology, and properties of polyacrylonitrile (PAN) membranes prepared by needleless electrospinning; Forming hollow fibers. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **105** [cit. 2023-03-01]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110151
- [28] NATARAJ, S.K., K.S. YANG a T.M. AMINABHAVI. Polyacrylonitrile-based nanofibers—A state-of-the-art review. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, **37**(3), 487-513 [cit. 2023-02-28]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.07.001
- [29] JAIN, Swati, Sruti CHATTOPADHYAY, Richa JACKERAY, C.K.V. ZAINUL ABID, Manoj KUMAR a Harpal SINGH. Detection of anti-tetanus toxoid antibody on modified polyacrylonitrile fibers. *Talanta* [online]. 2010, **82**(5), 1876-1883 [cit. 2023-03-03]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2010.08.003
- [30] Global Oxidized PAN Fiber Market by Type (LOI 45%-50%, LOI 51%-55%, LOI 56%-60%, Others), By Application (Automobile, Railway, Ship, Elevator, Aircraft, Others) And By Region (North America, Latin America, Europe, Asia Pacific and Middle East & Africa), Forecast From 2022 To 2030. In: *DATAINTELO* [online]. [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://dataintel.com/report/global-oxidized-pan-fiber-market/>

- [31] FIROUZI, Ehsan, Hassan HAJIFATHEALI, Ebrahim AHMADI a Mohammadreza MAREFAT. An Overview of Acrylonitrile Production Methods: Comparison of Carbon Fiber Precursors and Marketing. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* [online]. 2020, **17**(5), 570-588 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1570193X. Dostupné z: doi:10.2174/1570193X16666190703130542
- [32] RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Možnosti využití nanovláken v medicíně* [online]. [cit. 2022-12-27]. Dostupné z: <https://www.helpnet.cz/sites/default/files/Ruzickova.pdf>
- [33] COOPER, Ashleigh, Narayan BHATTARAI a Miqin ZHANG. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **85**(1), 149-156 [cit. 2022-12-27]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.02.008
- [34] BALOGH, Attila, Balázs FARKAS, Geert VERRECK, Jürgen MENSCH, Enikő BORBÁS, Brigitta NAGY, György MAROSI a Zsombor Kristóf NAGY. AC and DC electrospinning of hydroxypropylmethylcellulose with polyethylene oxides as secondary polymer for improved drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **505**(1-2), 159-166 [cit. 2022-11-13]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.024
- [35] PANDA, Dibya Sundar, Nabil K. ALRUWAILI, Kalpana SWAIN a Satyanarayan PATTNAIK. Ibuprofen Loaded Electrospun Polymeric Nanofibers: A Strategy to Improve Oral Absorption. *Acta Chimica*

Slovenica [online]. 2022, **69**(2), 483-488 [cit. 2022-12-27]. ISSN 15803155.
Dostupné z: doi:10.17344/acsi.2022.7370

- [36] JAIN, Swati, Sruti CHATTOPADHYAY, Richa JACKERAY a Harpal SINGH. Surface modification of polyacrylonitrile fiber for immobilization of antibodies and detection of analyte. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **654**(2), 103-110 [cit. 2023-03-04]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.08.030
- [37] PILVENYTE, Greta, Vilma RATAUTAITE, Raimonda BOGUZAITE, Arunas RAMANAVICIUS, Roman VITER a Simonas RAMANAVICIUS. Molecularly Imprinted Polymers for the Determination of Cancer Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2023, **24**(4) [cit. 2023-03-02]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24044105
- [38] LIM, Syazana Abdullah a Minhaz Uddin AHMED. Introduction to Immunosensors. In: AHMED, Minhaz Uddin, Mohammed ZOUROB a Eiichi TAMIYA, ed. *Immunosensors* [online]. The Royal Society of Chemistry, 2019, s. 1-20 [cit. 2023-03-16]. ISBN 978-1-78801-437-3. Dostupné z: doi:10.1039/9781788016162-00001
- [39] ZHANG, Yong a Qin WEI. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 2016, **781**, 401-409 [cit. 2023-03-17]. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2016.09.011
- [40] KERMAN, Kagan, Masato SAITO, Eiichi TAMIYA, Shohei YAMAMURA a Yuzuru TAKAMURA. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. *TrAC Trends in*

Analytical Chemistry [online]. 2008, **27**(7), 585-592 [cit. 2023-03-17]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.05.004

- [41] BONNE, Marc. *How Nanofibers can Improve the Performance of Biosensors* [online]. In: . [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/news.aspx?newsID=38157>
- [42] YARON, Hillman, Gershberg JENIA a Lustiger DAN. *Monoclonal Antibody-Based Biosensor for Point-of-Care Detection of Type III Secretion System Expressing Pathogens* [online]. *Analytical chemistry*, 2021, **98**(2) [cit. 2022-10-26]. ISSN 1520-6882. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03621>
- [43] LI, Wenjun, Xiuwen QIAO, Chenglin HONG, Chaoyun MA a Yiju SONG. A sandwich-type electrochemical immunosensor for detecting CEA based on CeO₂-MoS₂ absorbed Pb²⁺. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, **592** [cit. 2023-03-14]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2019.113566
- [44] NAGRAIK, Rupak, Avinash SHARMA, Deepak KUMAR, Soham MUKHERJEE, Fatih SEN a Avvaru Praveen KUMAR. Amalgamation of biosensors and nanotechnology in disease diagnosis: Mini-review. *Sensors International* [online]. 2021, **2** [cit. 2023-03-18]. ISSN 26663511. Dostupné z: doi:10.1016/j.sintl.2021.100089
- [45] LEE, Seungah, Junghwa LEE, Yingying CAO, Changuk AN a Seong Ho KANG. Nanomaterial-based single-molecule optical immunosensors for

- supersensitive detection. *Biosensors and Bioelectronics: X* [online]. 2022, **11** [cit. 2023-03-19]. ISSN 25901370. Dostupné z: doi:10.1016/j.biosx.2022.100191
- [46] HASANZADEH, Mohammad, Nasrin SHADJOU, Yuehe LIN a Miguel DE LA GUARDIA. Nanomaterials for use in immunosensing of carcinoembryonic antigen (CEA): Recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, **86**, 185-205 [cit. 2022-12-30]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.11.003
- [47] KAMEL, Hala Fawzy Mohamed a Hiba Saeed Bagader AL-AMODI. Cancer Biomarkers. In: WANG, Mu a Frank A. WITZMANN, ed. *Role of Biomarkers in Medicine* [online]. InTech, 2016, s. 1-33 [cit. 2023-03-03]. ISBN 978-953-51-2505-1. Dostupné z: doi:10.5772/62421
- [48] MANE, Prathamesh Parshuram, Rushikesh S. AMBEKAR a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. Electrospun nanofiber-based cancer sensors: A review. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, **583** [cit. 2023-03-20]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119364
- [49] TOPOLČAN, Ondřej a Judita KINKOROVÁ. Personalizovaná medicína. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2012, **26**(3), 121-122 [cit. 2023-03-12].
- [50] SINGH, Manish Pratap, Sandhya RAI, Ashutosh PANDEY, Nand K. SINGH a Sameer SRIVASTAVA. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes &*

Diseases [online]. 2021, 8(2), 133-145 [cit. 2023-03-13]. ISSN 23523042.
Dostupné z: doi:10.1016/j.gendis.2019.10.013

- [51] BAUER, Denis C., Clara GAFF, Marcel E. DINGER, Melody CARAMINS, Fabian A. BUSKE, Michael FENECH, David HANSEN a Lynne COBIAC. Genomics and personalised whole-of-life healthcare. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2014, 20(9), 479-486 [cit. 2023-03-14]. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2014.04.001
- [52] SHIIHARA, Masahiro a Toru FURUKAWA. Application of Patient-Derived Cancer Organoids to Personalized Medicine. *Journal of Personalized Medicine* [online]. 2022, 12(5) [cit. 2023-03-05]. Dostupné z: doi:10.3390/jpm12050789
- [53] PATSALIAS, Athanasios a Zuzana KOZOVSKA. Personalized medicine: Stem cells in colorectal cancer treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2021, 141 [cit. 2023-03-05]. ISSN 07533322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2021.111821
- [54] LAKSHMANAN, Vinoth-Kumar, Shreesh OJHA a Young Do JUNG. A modern era of personalized medicine in the diagnosis, prognosis, and treatment of prostate cancer. *Computers in Biology and Medicine* [online]. 2020, 126 [cit. 2023-03-05]. ISSN 00104825. Dostupné z: doi:10.1016/j.compbimed.2020.104020
- [55] KOUDELÁKOVÁ, Vladimíra, Magdalena KNEBLOVÁ a Marián HAJDÚCH. Personalizovaná medicína a biomarkery v onkologii. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2012, 26(4), 181-185 [cit. 2023-03-12].

Dostupné z:
<https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/04/06.pdf>

- [56] SVOBODA, Michal. *Molekulárne biomarkery v diagnostike a liečbe onkologických pacientov – od jedného génu ku komplexnému genomickému profilu* [online]. Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, Onkologický ústav sv. Alžbety, Oddelenie lekárskej genetiky [cit. 2023-03-05]. Dostupné z:
https://www.fmed.uniba.sk/fileadmin/lf/veda/svoc/SVOCprace/2022/28_Svoboda.pdf
- [57] MACIEJKO, Laura, Munisha SMALLEY a Aaron GOLDMAN. Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine: Emerging Technologies and Biomarker Based Approaches. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* [online]. 2017, 08(05) [cit. 2023-03-05]. ISSN 21559929. Dostupné z: doi:10.4172/2155-9929.1000350
- [58] FOXALL, McKenzie a Rebecca AREND. The Landscape of Personalized Medicine in Gynecologic Cancer. *Advances in Oncology* [online]. 2022, 2(1), 99-105 [cit. 2023-03-12]. ISSN 2666853X. Dostupné z: doi:10.1016/j.yao.2022.02.001
- [59] *Organoid vs. sféroid: Jaký je mezi nimi rozdíl?* [online]. In: . [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/organoid-vs-sferoid-jaky-je-mezi-nimi-rozdil/>

- [60] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- [61] NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0210-5.
- [62] JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-0595-3.
- [63] LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 2., přepracované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7853-6.
- [64] KAUŠITZ, Juraj, Ondřej TOPOLČAN, Marie KARLÍKOVÁ a Šárka SVOBODOVÁ. *Biomarkery v onkologii*. V Tribun EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, 2014. Knihovnicka.cz. ISBN 978-80-263-0857-7.
- [65] *Biomarkery* [online]. In: . [cit. 2022-12-29]. Dostupné z: https://postudium.cz/pluginfile.php/10345/mod_resource/content/1/Markery_unor_2014_v.pdf
- [66] KAUŠITZ, Juraj. *Nádorové markery*. Vydanie prvé. Bratislava: SOLEN, s.r.o., 2014, 147 stran. Meduca. ISBN 978-80-971340-1-3.
- [67] FENQI, Du, Liu YUPENG, Zhang QIUJU et al. Early Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Is a Stronger Independent Prognostic Factor for Stage II Colorectal Cancer Patients Than T4 Stage and

- Preoperative CEA. *Frontiers in Oncology* [online]. 2022, **11** [cit. 2022-08-18]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.758509
- [68] KANKANALA, Vijaya L. a Shiva Kumar R. MUKKAMALLA. Carcinoembryonic Antigen. *StatPearls Publishing* [online]. [cit. 2022-10-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK578172/>
- [69] SIREGAR, Gontar Alamsyah a Henry SIBARANI. Comparison of Carcinoembryonic Antigen Levels Among Degree of Differentiation and Colorectal Cancer's Location in Medan. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2019, **7**(20), 3447-3450 [cit. 2022-12-30]. ISSN 1857-9655. Dostupné z: doi:10.3889/oamjms.2019.442
- [70] VANACORE, Daniela, Mariarosaria BOCCELLINO, Sabrina ROSSETTI et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(30), 50240-50251 [cit. 2022-11-01]. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.16933
- [71] KARLÍKOVÁ, Marie, Ondřej TOPOLČAN a Šárka SVOBODOVÁ. *Nádorové markery* [online]. 2018 [cit. 2022-12-30]. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/tool/print/index.php?id=5348>
- [72] YE, Fei, Ying ZHAO, Ramy EL-SAYED, Mamoun MUHAMMED a Moustapha HASSAN. Advances in nanotechnology for cancer biomarkers. *Nano Today* [online]. 2018, **18**, 103-123 [cit. 2023-03-14]. ISSN 17480132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2017.12.008
- [73] HOU, Yanan, Jingdao WANG, Shantian LIU, Yuanling SUN, Yuxue DAI, Chuannan LUO a Xueying WANG. A novel flower-shaped Ag@ZIF-

67 chemiluminescence sensor for sensitive detection of CEA. *Talanta* [online]. 2023, **253** [cit. 2023-03-14]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2022.123938

- [74] TANG, Hao, Jinhua CHEN, Lihua NIE, Yafei KUANG a Shouzhuo YAO. A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2007, **22**(6), 1061-1067 [cit. 2023-03-15]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2006.04.027
- [75] MARTINS, Matthews S., Márcia H. NASCIMENTO, Leonardo L. BARBOSA et al. Detection and quantification using ATR-FTIR spectroscopy of whey protein concentrate adulteration with wheat flour. *LWT* [online]. 2022, **172** [cit. 2023-04-03]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2022.114161
- [76] MÅGE, Ingrid, Ulrike BÖCKER, Sileshi Gizachew WUBSHET, Diana LINDBERG a Nils Kristian AFSETH. Fourier-transform infrared (FTIR) fingerprinting for quality assessment of protein hydrolysates. *LWT* [online]. 2021, **152** [cit. 2023-04-04]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112339
- [77] SPALDING, Katie, Franck BONNIER, Clément BRUNO et al. Enabling quantification of protein concentration in human serum biopsies using attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* [online]. 2018, **99**, 50-58 [cit. 2023-04-04]. ISSN 09242031. Dostupné z: doi:10.1016/j.vibspec.2018.08.019

- [78] MAGALHÃES, Sandra, Dário TRINDADE, Tânia MARTINS et al. Monitoring plasma protein aggregation during aging using conformation-specific antibodies and FTIR spectroscopy. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2020, **502**, 25-33 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2019.11.025
- [79] ZHENG, Kangle, Liqing WU, Zhangjing HE, Bin YANG a Yi YANG. Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement* [online]. 2017, **112**, 16-21 [cit. 2023-03-28]. ISSN 02632241. Dostupné z: doi:10.1016/j.measurement.2017.08.013
- [80] LIU, Zelong a Junhui PAN. A practical method for extending the biuret assay to protein determination of corn-based products. *Food Chemistry* [online]. 2017, **224**, 289-293 [cit. 2023-03-28]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.12.084
- [81] YANG, Taotao, Yansha GAO, Zhen LIU, Jingkun XU, Limin LU a Yongfang YU. Three-dimensional gold nanoparticles/prussian blue-poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite as novel redox matrix for label-free electrochemical immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2017, **239**, 76-84 [cit. 2023-04-15]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2016.08.001

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Chování kapky polymeru podle intenzity elektrického pole A) Kapka polymeru bez působení elektrického pole, B) Kapka připomínající tvar mističky, C) Stacionární vlny na hladině kapky, D) Stacionární vlny a vznikající tryska, E) Kapalinové trysky [10]	14
Obrázek 2 – Uspořádání zařízení Nanospider A) Schématické B) Reálné [18; 19; upraveno]	15
Obrázek 3 – Schéma biosenzoru [39; upraveno].....	25
Obrázek 4 – Klinické využití biomarkerů [47; upraveno]	35
Obrázek 5 – Nanospider™ [vlastní tvorba]	42
Obrázek 6 – Jezdec se zásobníkem na polymer [vlastní tvorba]	43
Obrázek 7 – A) Hliníkové nosiče vzorku s připevněnými nanovláknem, B) Přístroj Q150R S, sloužící k pozlacení vrstvy nanovláken [vlastní tvorba]	44
Obrázek 8 – A) Rastrovací elektronový mikroskop (SEM) VEGA 3 TESCAN, B) Kontrola kvality nanovláken [vlastní tvorba]	45
Obrázek 9 – A) Lis pro homogenizaci vzorku, B) FTIR spektrofotometr [vlastní tvorba].....	47
Obrázek 10 – Schéma vyrobeného bionanosenzoru pro detekci CEA [43; upraveno]	47
Obrázek 11 – Manipulace s nanovláknem pomocí pinzety [vlastní tvorba] ...	49
Obrázek 12 – Rozprostřená nanovláknem na Petriho miskách [vlastní tvorba].....	50
Obrázek 13 – Transiluminátor s fotodokumentací [vlastní tvorba]	51
Obrázek 14 – A) Nanovláknem po přidání biuretového činidla, B) Nanovláknem po promytí [vlastní tvorba].....	52
Obrázek 15 – Rozpůlená kyveta s napnutým nanovláknem [vlastní tvorba].....	53

Obrázek 16 – UV-VIS-NIR spektrofotometr Shimadzu UV-3600 [vlastní tvorba].....	53
Obrázek 17 – FTIR spektrum PAN nanovláknů bez protilátky [vlastní tvorba].....	54
Obrázek 18 – FTIR spektrum PAN nanovláken s protilátkou [vlastní tvorba].....	55
Obrázek 19 – Nanovláknů na transiluminátoru při 254 nm [vlastní tvorba].....	56
Obrázek 20 – Absorpční spektra PAN nanovláken s navázaným CEA [vlastní tvorba].....	59

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Hladiny koncentrací CEA.....	37
Tabulka 3 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v kalibrační řadě CEA..	57
Tabulka 4 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v kalibrační řadě CEA..	57
Tabulka 5 – Intenzita PAN nanovláken po inkubaci v ředěné kalibrační řadě CEA	58
Tabulka 6 – Absorbance PAN nanovláken 1. šarže po inkubaci v kalibrační řadě CEA	60
Tabulka 7 – Absorbance PAN nanovláken 2. šarže po inkubaci v ředěné kalibrační řadě CEA.....	60