

**Karlova Univerzita v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Mgr. Romana Křivohlavá**

Využití nanodiamantových nosičů pro podání genové terapie

Rigorózní práce

Školitel: RNDr. Veronika Benson, PhD

Praha, 2021

**Charles University in Prague**

**Faculty of Science**

Study program: Biology

Study branch: Immunology



**Mgr. Romana Křivohlavá**

Use of nanodiamond carriers for gene therapy

Rigorosum thesis

Supervisor: RNDr. Veronika Benson, PhD

Prague, 2021

**Prohlášení autora:**

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

V Praze dne

Mgr. Romana Křivohlavá

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí rigorózní práce Veronice Benson za cenné rady, pomoc, podporu a trpělivost. Evě Neuhöferové za pomoc a podporu a oběma za vytvoření přátelské atmosféry a možnosti strávit s nimi nezapomenutelné chvíle v akademickém prostředí.

V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, bez které bych tuto práci nemohla dokončit. Rodičům, manželovi a dětem Davidkovi a Klárce.

## Abstrakt:

Nanodiamanty (ND) mohou být použity jako nosiče RNA. Navázání RNA na nanodiamanty a způsob podání komplexu významně mění jejich osud, toxicitu a účinnost v mnohobuněčném systému. Hlavním cílem této práce bylo vyvinout nanodiamantový komplex, sloužící jako nástroj k efektivnímu doručení RNA *in vivo*. K tomuto účelu jsme vytvořili komplex (NDA135b), který se skládal z ND, polymeru, antisense RNA a transferinu.

Našimi dílčími cíli bylo (i) posoudit, zda nádorově specifické potažení povrchu nosiče má vliv na akumulaci NDA135b v nádoru a účinně inhibuje tvorbu onkogenních miR-135b a (ii) pokusit se definovat nespecifické cíle a interakce imunitních buněk. Nejprve jsme testovali toxicitu a účinnost NDA135b *ex vivo* ve sférách tvořených nádorovými buňkami, kokultivovanými s imunitními buňkami. Zjistili jsme, že NDA135b cílí na nádorové buňky, ale váže se také na granulocyty. Poté jsme použili NDA135b *in vivo*. Komplex byl podaný intravenózně a intratumorálně do zvířat kmene Balb/c nesoucích nádor. Aplikace NDA135b *in vivo* vedla k účinnému potlačení produkce (knockdown) microRNA-135b v nádorové tkáni bez ohledu na způsob podávání. Pouze v případě intravenózní aplikace se NDA135b dala detekovat v periferní krvi a v moči a snížila granularitu splenocytů. Naše výsledky ukazují, že intratumorální aplikace NDA135b představuje vhodný a bezpečný přístup pro *in vivo* použití nanodiamantových komplexů. Systémové intravenózní podání vedlo k interakci NDA135b s dotčenými buňkami a tkáněmi a vyžaduje tedy další přezkoumání bezpečnosti použití.

**Klíčová slova:** nanodiamant, cílené nanočástice, použití *in vivo*, cílení nádorových buněk, antimiR, nano-bio interakce

Abstract:

Nanodiamonds (ND) serve as RNA carriers with potential for *in vivo* application. ND coatings and their administration strategy significantly change their fate, toxicity, and effectivity within a multicellular system. Our goal was to develop multiple ND coating for effective RNA delivery *in vivo*. Our final complex (NDA135b) consisted of ND, polymer, antisense RNA, and transferrin.

We aimed (i) to assess if a tumor-specific coating promotes NDA135b tumor accumulation and effective inhibition of oncogenic microRNA-135b and (ii) to outline off-targets and immune cell interactions. First, we tested NDA135b toxicity and effectiveness in tumorspheres co-cultured with immune cells *ex vivo*. We found NDA135b to target tumor cells, but also to interact with granulocytes. Then, we followed with NDA135b intravenous and intratumoral applications in tumor-bearing animals *in vivo*. Application of NDA135b *in vivo* led to the effective knockdown of microRNA-135b in tumor tissue regardless of administration. Only intravenous application resulted in NDA135b circulation in peripheral blood and urine and it decreased granularity of splenocytes. Our data showed that localized intratumoral application of NDA135b represented a suitable and safe approach for *in vivo* application of nanodiamond-based constructs. Systemic intravenous application led to an interaction of NDA135b with bio-interface, and it will need further examination regarding its safety.

Key words: nanodiamond, targeted nanoparticles, *in vivo* application, cancer cell targeting; antimiR; nano-bio interaction

<b>Literární přehled</b>	1
<b>Nanodiamanty</b>	1
Využití nanodiamantů	3
Biodistribuce a toxicita nanodiamantů	4
Protinádorová terapie a nanodiamanty	6
<b>miR a interferující RNA</b>	8
MicroRNA (miR)	8
miR v medicíně a v terapii nádorů	9
Interferující RNA	10
<b>Nádorové buňky</b>	13
Karcinom prsu	13
Léčba karcinomu prsu	15
Karcinom prsu v myším modelu	16
4T1	17
Karcinom prsu a miR	17
Nádorové prostředí a miR-135b	18
<b>miR a regulace imunity</b>	19
Regulace hematopoetické kmenových buněk	20
Regulace přirozené imunity pomocí miR	20
Regulace adaptivní imunity pomocí miR	22
Patologie dysregulace miR	25
Onkomiry a MiR nádorové supresory	25
Nádorové onemocnění krve	25
Autoimunitní choroby	25
Role miR-135b v imunitních funkcích	25
<b>Cíle práce</b>	27
<b>Seznam citované literatury</b>	28
<b>Publikace</b>	39

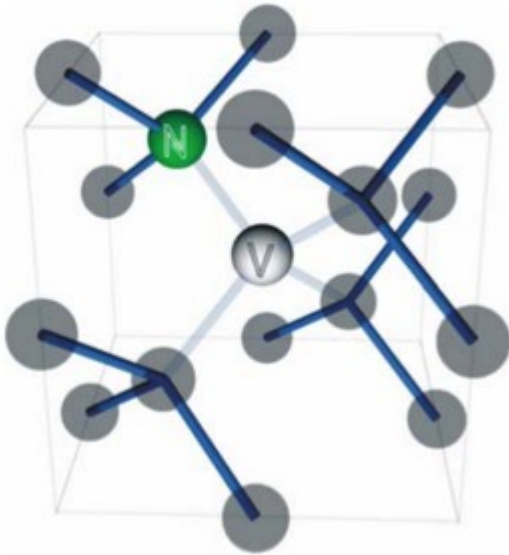
# Literární přehled

## Nanodiamanty

Nanodiamanty jsou nanočástice tvořené uhlíkem s unikátními vlastnostmi a použitím. Dají se nalézt volně v přírodě v surové ropě, v meteoritech, v mezihvězdném prachu, v protoplanetární mlhovině a v určitých usazeninových vrstvách na zemi (Eldawud et al., 2016). Můžou být ale také vyráběny v laboratorních podmínkách. Nanodiamanty jako takové nejsou v laboratorním světě novinkou a byly vyráběny již v 60. letech minulého století, na počátku 90. let 20. století začal jejich rozkvět a popularita a zájem o využití nanodiamantů prudce stoupala (Danilenko et al., 2004).

Nanodiamantové nanočástice mají uhlíkovou strukturu s velikostí od dvou do několika desítek nanometrů. Uvnitř nanodiamantů jsou grafitové ( $sp^2$ ) a diamantové ( $sp^3$ ) vazby a může zde vzniknout strukturální defekt (Chang et al., 2008). Typické defekty jsou boronové nebo nitrogenové (Jelesko a Wrachtrup, 2006) a nepředstavují pro nás problém, naopak nám poskytují výhody při dalším využití nanodiamantů. Opticky jsou na nanodiamantech nejzajímavější dusíkové defekty, které mohou vznikat samovolně nebo mohou být vyrobeny uměle (Bradac et al., 2010). Pokud je volné místo vedle nitrogenového defektu v nanodiamantové mřížce, nazývá se NV centrum a může mít dva rozdílné náboje - neutrální ( $NV^0$ ) a negativní ( $NV^-$ ) (Petřáková et al., 2015). Oba typy NV center v nanodiamantech mají rozdílné optické a magnetické vlastnosti (Davies, 1976, Petřáková et al., 2011), zatímco nanodiamanty s  $NV^-$  centry mají maximum intenzity emise kolem červené barvy (590-625 nm), nanodiamanty s  $NV^0$  centry mají maximum intenzity emise pohybující se kolem oranžové barvy (650-750 nm). Oba dva typy mají emisi stabilní bez vysvěcování nebo blikání (Petřáková et al., 2011).





Obr. 1 Schématický náčrt NV centra v nanodiamantové struktuře. Volně převzato z Jelezko a Wrachtrup, 2006

Nanodiamanty se dají vyrobit v zásadě třemi typy metod: chemická odpařovací metoda (chemical vapor deposition), detonační metoda a výroba vysokým tlakem a teplotou (HPHT high pressure/high temperature).

Prvně vynalezenou metodou byla výroba vysokým tlakem a teplotou, jejímž výsledkem jsou nanodiamanty o velikosti několika desítek nanometrů do jednoho centimetru ve velmi vysoké kvalitě a čistotě bez další směsi uhlíkových struktur. Používání těchto nanodiamantů je běžné v průmyslu na řezání nebo k přípravě ochranných vrstev na různých materiálech (Bovenkerk, 1959, Bundy, 1955). Dále se tyto nanodiamanty používají v medicíně a to z důvodu jejich nízké toxicity a možností úpravy nanodiamantu tak, aby se zvýšila fluorescence (Tsai L. W. et al., 2016). Ta je nástrojem k použití nanodiamantů jako optických sond (Alkahtani et al., 2018).

Další metoda je příprava nanodiamantů detonační technikou, kterou se získají nanodiamanty o rozměru kolem 5 nanometrů, často se ovšem shlukují do klastrů, proto bývá nutné je před použitím oddělit a vyčistit. Využití mají především v biomedicíně (Dolmatov et al., 2013).

Posledním způsobem výroby nanodiamantů je metoda chemické vaporizace (chemical vapor deposition - CVD), kde se jako základní vrstva využijí nanodiamanty vytvořené detonační

technikou a za přítomnosti atomického vodíku rostou na této vrstvě nanodiamanty za nízkého tlaku (Choy, 2003, May, 2000).

## Využití nanodiamantů

Použití nanodiamantů je neuvěřitelně široké. Jedná se totiž o materiál s unikátními vlastnostmi jako jsou **tvrdost** - nanodiamant je 50x tvrdší než nerezová ocel a činí je tedy ideální k výrobě nejrůznějších řezacích nástrojů (van der Laan et al., 2018). Dále je nezanedbatelnou vlastností **biokompatibilita** - nanodiamanty se zdají být netečné k buňkám a buňky v jejich přítomnosti nevykazují morfologické změny (Zhu Y. et al., 2012). Ani při použití *in vivo* ve zvířatech nedochází zřejmě k poškozování orgánů (Van der Laan, K. et al., 2018), i když případná akumulace nanodiamantů v organismu není ještě zcela vyjasněna (Schrand et al., 2009, Vijayanthimala a Chang, 2009, Krivohlava et al. 2019, Simkova et al. 2020). **Fotoluminiscence** je u HPHT nanodiamantů další nepřehlédnutelnou vlastností - nanodiamanty se dají využít jako biomarkery či fluorescenční značky a na rozdíl od běžně využívaných fluorescenčních markerů jsou stabilní, nejsou náchylné k vysvěcování či kolísání intenzity luminiscence (Ni et al., 2020). V neposlední řadě jsou v porovnání s běžnými fluorescenčními markery levnější (Chang et al., 2019). Také **povrchové vlastnosti** nanodiamantů vybízejí k biomedicínskému využití, povrch může být modifikován různými metodami a nejrůznějšími molekulami a sloužit jako nástroje k transportování molekul do buněk (Tinwala a Wairkar, 2019). Všechny tyto vlastnosti jsou významnými přednostmi ve využití nanodiamantů v biomedicíně. Nanodiamanty se totiž dají použít v nejrůznějších odvětvích medicíny, například v ortopedii (Suliman et al., 2015), k výrobě kontaktních čoček (Kim et al., 2014), magnetometrii na jedné buňce (Balasubramanian et al., 2008), studii toxicity na bezobratlých a hlodavcích (Mohan et al., 2010), cílenou léčbu nádorových buněk (Wang et al., 2014) a při preklinických studiích léčby rakoviny prsu (Moore et al., 2013). Při navázání gadolinia na nanodiamant se zlepšují možnosti zobrazování v rámci využití při kontrastním zobrazování (Manus et al., 2010). Nanodiamanty mohou sloužit jako základ pro antimikrobiální aplikace, jejich povrch dovoluje navázat vhodné antimikrobiální látky a sloužit k diagnostice a léčbě mikrobiálních infekcí (Hartmann et al. 2012).

Nanodiamanty jsou vhodné k použití jako substráty pro navázání proteinů, nukleových kyselin a mnoha dalších funkčních skupin. Na rozdíl od dalších uhlíkatých sloučenin jsou nanodiamanty považované za netoxické. Při porovnání s grafenem ve studii Zhang et al., 2012

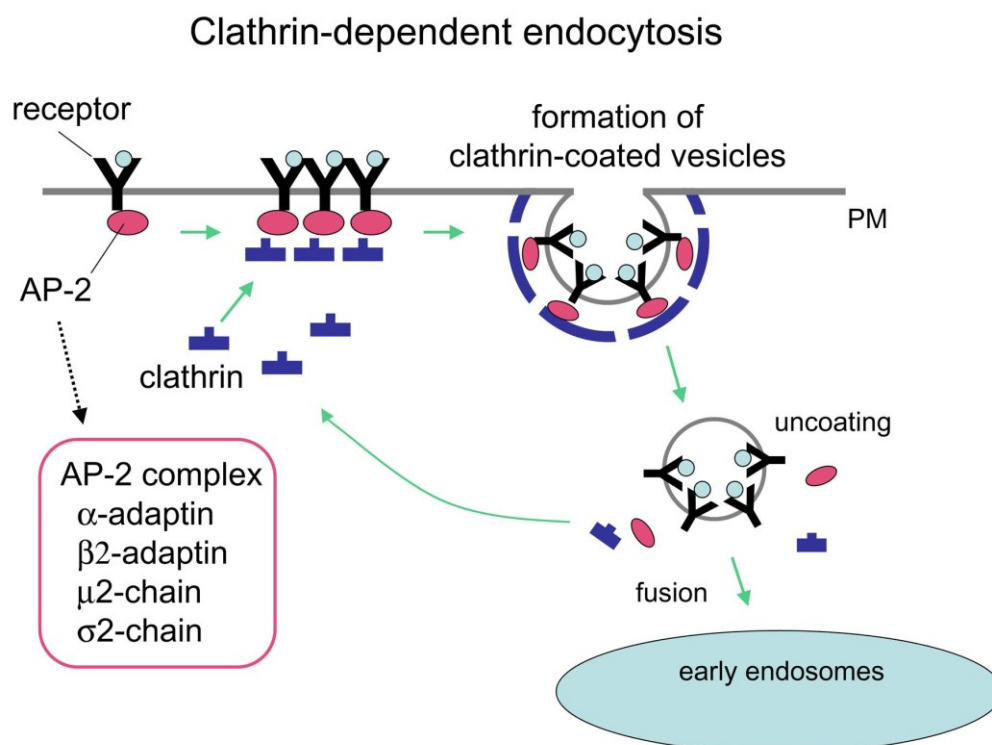
byla ukázána menší toxicita, která může souviset s mírou poškození cytoplazmatické membrány. Nejlepší biokompatibilitu vykazují nanodiamanty vytvořené metodou HPHT (Chipaux et al., 2018).

## Biodistribuce a toxicita nanodiamantů

Využívání nanodiamantů v biologii a medicíně sebou přineslo otázku bezpečnosti využití nanočástic v živých organismech. Obecně se organismy s nanomateriály vyrovnávají několika způsoby, mohou je zcela ignorovat, adaptovat se na ně, nebo na nanomateriál reagovat aktivací imunitní odpovědi a zánětem. Všechny tři reakce se považují za bezpečné z hlediska imunitní odpovědi. Pouze pokud je reakce aktivace imunitní odpovědi a zánětu abnormální (prodloužená, příliš velká atd.), může to přinášet patologické následky (Boraschi et al., 2020). U háďátka *Caenorhabditis elegans* byla ukázána bezpečnost a biokompatibilita fluorescenčních nanodiamantů (Mohan et al., 2010) a to po podání nanodiamantů do trávicí trubice i u injekce do gonád. Při studiu intravenózního podání byl použitý myší model a fluorescenční nanodiamanty a byla zjišťována akumulace v plicích, slezině, játrech a ledvinách. Velmi rychlá byla exkrece z plic, postupné snižování množství nanodiamantů bylo pozorováno ve zbývajících orgánech (Chow et al., 2011). Některé další studie ukazují, že nanodiamanty jsou tolerovány i ve velkých dávkách. Existují ale i studie, které poukazují na hematotoxicitu nanodiamantů (Kumari et al., 2014), které shlukují krevní destičky a mohou mít trombogenní potenciál. Jiné studie hovoří o vysoké biokompatibilitě nanodiamantů, avšak upozorňují na genotoxicitu těchto částic (Xing et al., 2011), kterou dokládá mírným zvýšením exprese proteinů, které jsou zodpovědné za opravu DNA (p53 a MOGG-1). Autor dalšího článku Magrez et al., 2006, ukazuje, že míra toxicity může být závislá na přidání kyselých skupin (karbonylové, karboxylové a hydroxylové skupiny), které po navázání na povrch nanodiamantů redukuje počet živých buněk.

Ani v případě přímého působení nanodiamantů na nádorové buňky nebyla zjištěna zvýšená cytotoxicita při testování na HeLa buňkách a zmiňovaná cytotoxicita byla závislá na přítomnosti sérových proteinů v médiu (Li et al., 2010). Při dlouhodobé kultivaci nádorových buněk A549 (nádor plic) v porovnání s 3T3 buňkami neukazovaly buňky sníženou viabilitu a zároveň neovlivňovaly dělení buněk (Liu et al., 2009).

Distribuce nanodiamantů v buňce začíná pohlcení částice buňkou. Nanodiamanty jsou buňkami pohlcovány především klathrinovým typem endocytózy, závislým na energii (Liu et al., 2009, Vijayanthimala et al., 2009) – obr. 2.



Obr. 2 Způsob pohlcování nanodiamantů buňkami, PM plazmatická membrána. Převzato z publikace Grant et al., 2006

*In vivo* toxicita je také na předních místech zájmu při práci s nanodiamanty. Zpočátku byla plicní toxicita při vdechování nanodiamantů studována Wang et al., 2004 u myši a ukázala, že nanodiamanty nemají žádné závažné vedlejší účinky na plíce a jsou považovány za částice s nízkou toxicitou k plicní tkáni. Použitá koncentrace nanodiamantů byla 0,1 a 1 mg/kg. Při studiu distribuce a translokace nanodiamantů v plicích hrají zřejmě důležitou roli plicní makrofágy, které zajišťují odstraňování částic z těla (Yuan et al., 2010). V práci Zhang et al., 2010 byla dokázána dávkově závislá toxicita u plic, jater, ledvin a v krvi. Použitá dávka byla 0,8; 4; 20 mg/kg. Dlouhodobá orální aplikace u myši (Puzyr et al., 2007), která trvala 3-6 měsíců a zahrnovala 0,002 až 0,05 wt % nanodiamantů v hydrosolu (celková dávka za celou dobu trvání experimentu dosáhla k 16 mg až 450 mg nanodiamantů v hydrosolu), nezpůsobila smrt zvířete či změnu orgánové hmotnostní dynamiky (játra, plíce, srdce, ledviny, slinivka) a nijak neovlivnila schopnost rozmnožování zvířete. Bakowitz a Mitura, 2002 ukázali, že při

intraperitoneální aplikaci nanodiamantů desátý den po aplikaci nevykazují potkani žádnou imunitní reakci. U intravenózní aplikace ukázala práce Yuan et al., 2009, že nanodiamanty se přednostně akumulují v játrech, slezině a plicích a použili k tomu nanodiamanty vázané na radioaktivní jód ( $^{125}\text{I}$ ). Více než 60% z aplikovaných nanodiamantů byly nalezeny již po půl hodině v játrech myši a hladina zůstala konstantní dalších 28 dní. Jiný radionuklid byl použitý v práci Rojas et al., 2011 a to  $^{18}\text{F}$  a pomohl ukázat, že po intravenózní aplikaci byly nanodiamanty přítomny především v plicích, slezině, játrech a vylučovány do močového měchýře. Také se v této studii podařilo zjistit, že pokud se filtrací odstraní velké částice nanodiamantů, zabrání se jejich absorpci v plicích a slezině a dojde k signifikantní redukci v játrech.

## Protinádorová terapie a nanodiamanty

Nejrozšířenějším použitím v nádorové terapii je navázání jednoho nebo více typů léčiva na nanodiamant. Léčiva vázaná na nanodiamantech se používají ve dvou formách - první je navázání nanodiamantů na chemický substrát, který vytvoří tenký film. Druhou formou je použití spontánně tvořených nanodiamantových klastrů, takzvaný nanodiamantový hydrogel.

**Nanodiamanty ve formě tenkého filmu** se dají připojit k nejrůznějším biologicky aktivním molekulám, například ve studii Huang et al., 2008 byla nanodiamantová vrstva obohacena o dexametazon, což je účinný protizánětlivě působící glukokortikoid, který se pomalu z aktivní vrstvy uvolňoval a tím redukoval nežádoucí vedlejší účinky na normální, zdravé buňky. Jiná studie (Lam et al., 2008) ukazuje použití nanodiamantového filmu se zároveň navázaným doxorubicinem a klade důraz na pomalé a relativně stálé uvolňování léčiva.

V rámci protinádorové terapie bylo využito toho, že nanodiamanty na sobě mohou nést stabilní dávku léčiva, látka se uvolňuje z povrchu postupně, je redukována cytotoxicita, na rozdíl od jiných nosičů podobného chemického složení. Vyžívá se taky schopnosti **nanodiamantů shlukovat se do klastrů** a tím zvyšovat účinek protinádorových terapií, které jsou cílené na buňky rezistentní k léčivu (Chang et al., 2011). Ukázalo se taky, že agregované částice s léčivou zvyšovaly účinek protinádorové terapie zvýšením koncentrace cirkulujícího léčiva (Chow et al., 2011). Navázání protinádorového léčiva je věcí velkého zájmu a výsledky studií ukazují, že například při navázání nanodiamantů na antracyklinová léčiva, kam patří doxorubicin,

epirubicin a daunorubicin, se zvyšuje účinek léčiva u nádorů rezistentního ke konkrétnímu léčivu (Chow et al., 2011). Nádorové buňky totiž ztrácejí schopnost aktivně se zbavovat protinádorového léčiva a proto je při léčbě též možné snižovat dávku už tak poměrně vysoce toxického doxorubicinu. Zatímco spojení doxorubicinu s nanodiamanty je ukázkou pasivního doručení léčivé komponenty, léčba nanodiamanty spojené s protilátkou proti EGFR jsou ukázkou aktivního doručení léčiva. Experimenty prováděla skupina vedená Zhang et al., 2011 a používala fluorescenční nanodiamanty a linii lidského karcinomu prsu MDA-MB-231. Podařilo se v nich zlepšit specifitu doručování nanodiamantů do buněk. Podobnou cestou se vydala i skupina Moore et al. 2013 která využila stejnou specifickou protilátku, navíc použili komplex nanodiamantů s epirubicinem, který byl enkapsulován v liposomu a na povrchu byla navázána specifická protilátka. Dosáhli tím kompletní regrese růstu nádoru *in vivo*.

Chemorezistence je vážnou komplikací při léčbě nádorů, tuto překážku by ale bylo možno obejít právě vazbou léčiva na nosič, který zvýší efektivitu léčby. Příkladem mohou být experimenty Wang et al., 2014, kde léčba nádoru jater epirubicinem navázaným na nanodiamanty byla efektivnější než léčivem samotným.

Velmi úspěšnými se zdají být kombinované nanoterapie, složené z nanodiamantů a dalších materiálů nebo přímo funkcionalizované terapeutické nanodiamantové částice. To se daří především díky unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem povrchu nanodiamantů.

A proto mohou nanodiamanty být nejen perspektivními nástroji doručování léčiv do buněk, ale zároveň díky nízké cytotoxicitě a nemožnosti vysvěcování, vhodnými nástroji pro dlouhodobé sledování částice nanodiamantu uvnitř buňky (Fu et al., 2007).

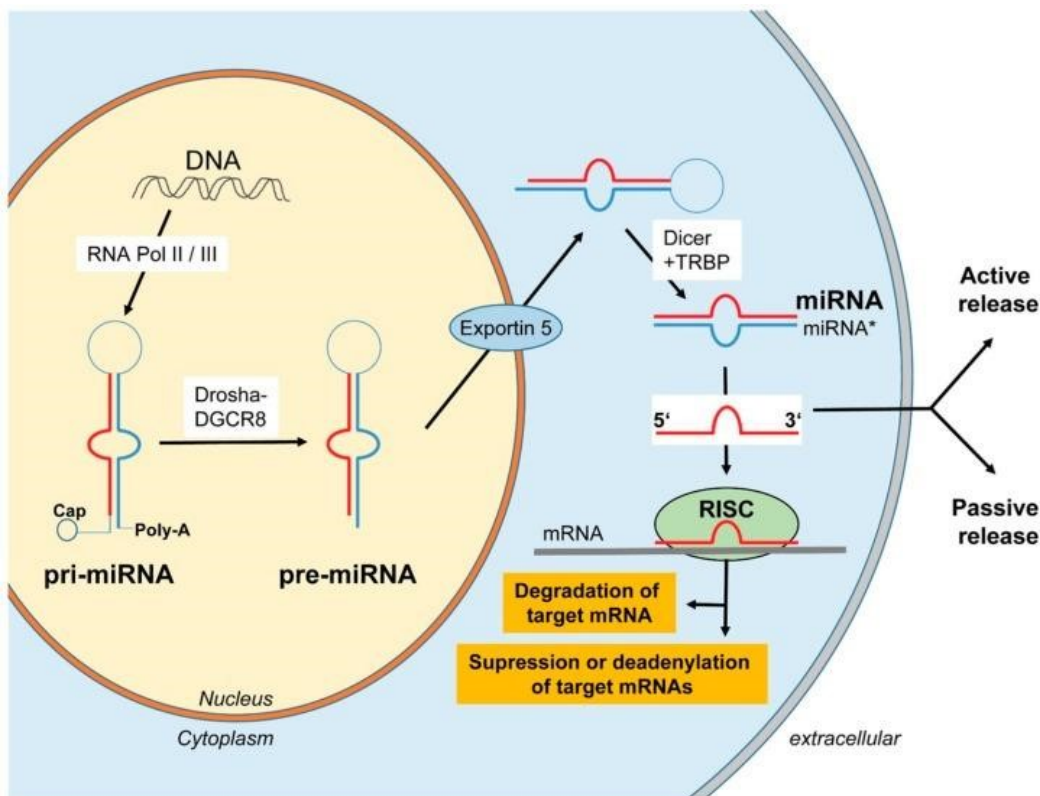
# miR a interferující RNA

## MicroRNA (miR)

MiR jsou krátké, kolem 21-23 nukleotidů dlouhé, jednovláknové nekódující řetězce RNA. Byly objeveny v mnoha eukaryotických organismech, od rostlin až po člověka. K objevení MiR došlo v roce 1993 v týmu Leea a jeho spolupracovníků v laboratoři Victora Ambrose (Lee et al., 1993).

Funkce miR spočívá v regulaci exprese genů. MiR u živočichů je komplementární k regionu 3'UTR, což je část mRNA, která nekóduje proteiny, ale vykonává regulační funkce na dané molekule mRNA. Jiným typem je rostlinná miR, která je komplementární ke kódujícím regionům mRNA. Při nasednutí miR na mRNA dochází nejčastěji k inhibici translace nebo k rozkladu mRNA (což je proces podobný inhibici mRNA pomocí molekul siRNA). Někdy může být označovaná jako miRNP (miRNARibonukleoproteinový komplex) a působit i v jádře.

MiR vzniká v jádře v podobě asi 70ti nukleotidů dlouhých řetězců pri-miR (primary miR) s čepičkou na 5' konci a polyadenylované sekvenci na 3' konci. Následná úprava je realizována u živočichů v proteinovém komplexu - mikroprocesor komplex, který je složený z ribonukleázy III Drosha a proteinu Pasha, zde se přemění pri-miR na pre-miR. Pre-miR je transportovaná do cytoplazmy pomocí proteinu Exportin-5 (Obr. 3 Benz et al., 2016), kde interaguje s PAZ doménou endonukleázy Dicer a vzniká 18-24 nukleotidů dlouhá jednovláknová miR. miR se váže na komplex RISC (RNA-induced silencing complex), který je schopný tlumit expresi genů (tzv. RNA interference) a to inhibicí translace nebo indukcí štěpení mRNA.



Obr. 3 Schéma vzniku a fungování miR přejaté z publikace Benz et al., 2016

## miR v medicíně a v terapii nádorů

MiR jsou molekuly, které mají v medicíně čím dál větší důležitost a je na ně obrácená velká pozornost. Mohou sloužit nejen jako markery, ale i jako cílové molekuly pro sledování zdravotního stavu člověka, prevenci a léčbu celé řady onemocnění. miR je molekula, která může ovlivňovat apoptózu, proliferaci a migraci buněk a hrát tím důležitou úlohu v rozvoji a regulaci nádorového bujení. U člověka můžeme hladiny jednotlivých miR vyšetřovat v tělních tekutinách jako jsou sliny, krev, moč, sputum, bronchoalveolární tekutina a tkáních.

MiR mohou být využity jako důležité biomarkery při monitorování celé řady zdravotních stavů člověka jako jsou nádorové, srdeční a plicní onemocnění (např. infarkt, astma, cystická fibróza, obstrukční plicní onemocnění), vrozené vady (např. ledvin), autoimunitní onemocnění (autoimunitní zánětlivá onemocnění střeva, roztroušená skleróza, Jagot et al., 2016), stárnutí, cirhóza, neuropsychické onemocnění (např. schizofrenie Kichukova et al., 2015, Alzheimerova choroba Li et al., 2016), osteoporóza (Sun et al., 2016), funkce krevních destiček (Lindsay et



al., 2016), preeklampsie (Jairajpuri a Almawi, 2016), endometriózy (Mari-Alexandre et al., 2016), sepse (Benz et al., 2016), při asistované reprodukci (Liu et al., 2016) nebo onemocněních ústní dutiny (Kim et al., 2015).

MiR molekuly mohou být důležité regulátory u rakoviny, hojení diabetických ran, chronické hepatitidy C (Lee et al., 2016), diabetické nefropatie (Simpson et al., 2016), kardiomyopatie (Thum et al., 2007) a dalších stavů a onemocnění.

Využití malých RNA molekul bude pravděpodobně v lékařství uplatnitelné v rámci léčby a podpory léčby různých typů nádorů, hepatitidy C, renálních onemocnění (Denby a Baker, 2016) a potenciálně mnoha jiných onemocnění.

## Interferující RNA

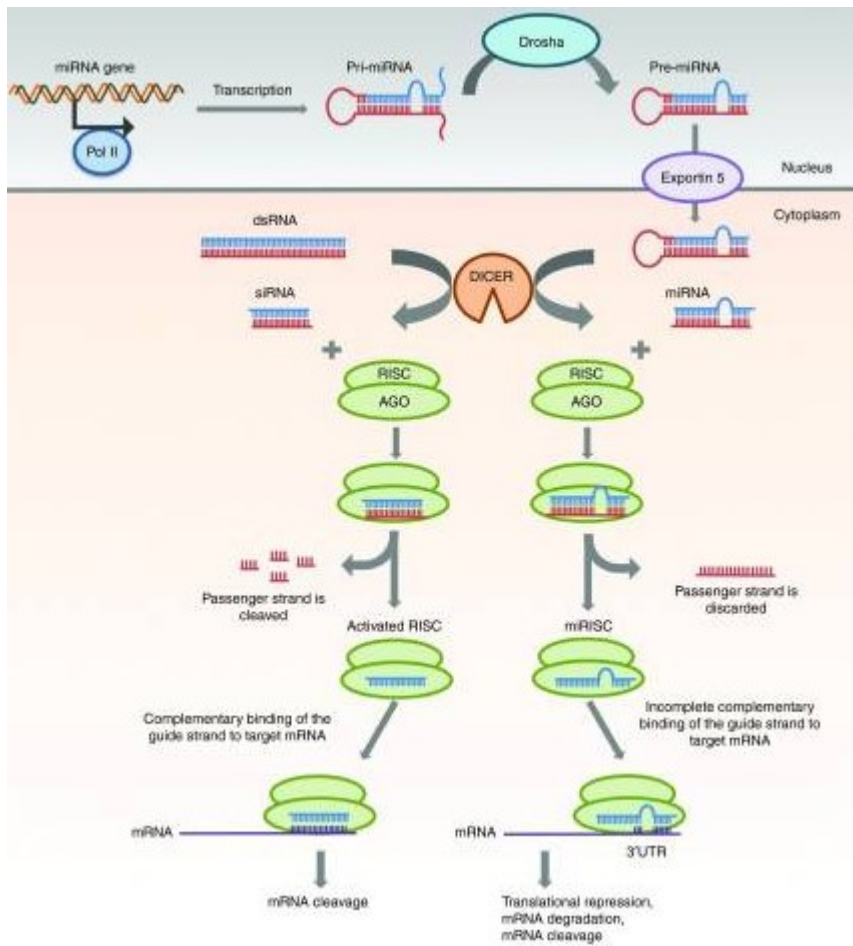
Malé interferující RNA mohou být obecně vzato dva typy (Tab. 1). Oba jsou zpracovány enzymem Dicer a inkorporovány do komplexu RISC. Tzv. **siRNA** je dvouřetězcová RNA, která má exogenní původ a vstupuje do buňky pomocí vektoru. **miR** je jednořetězcová RNA a je vytvořena uvnitř těla a její původ je v intronech delších molekul RNA. Pokud se naváže RISC komplex na cílovou mediátorovou RNA, dochází k interferenci mRNA s siRNA nebo miR, což může vést k potlačení exprese mRNA, buď úplnou degradací cílové mRNA nebo zabráněním translace mRNA.

V buňce jsou ve zvýšeném množství některé molekuly miR asociované s nádorovým bujením v porovnání se zdravými buňkami. Tyto molekuly se nazývají onkomiry a první zmínka souvislosti mezi miR a nádorovými buňkami je z roku 2002 v publikaci Calin et al. Předpokládáme-li, že onkomiry působí na nádorové buňky proliferačně, mohlo by se nám při snížení množství onkomirů podařit snížit proliferaci nádorových buněk. V naší práci jsme se zaměřili na onkomir miR-135b, jehož vyšší hladina byla prokázána u karcinomu prsu (Xin et al., 2015), nádorového modelu, kterému se věnujeme. Molekuly, které se používají ke snížení hladiny onkomirů se nazývají antagomiry a jsou komplementární k dané jednovláknové molekule miR a vážou se na ní (Krützfeldt, 2005). Vazba antagomirů ke komplementárním molekulám RNA je známá již od roku 1998 a nazývá se RNA interference (Fire et al., 1998) a od doby, kdy byl tento proces objeven se mnoho vědců tímto fenoménem začalo zabývat.

Ukázalo se totiž, že by mohl mít velký vliv na řízení funkcí v buňce na molekulární úrovni (Downward, 2004) a to nejen u nádorových modelů.

Tab. 1 Srovnání siRNA a miR (volně převzato z Lam et al., 2015)

	siRNA	miR
Struktura	20-23 nukleotidů RNA	19-25 nukleotidů
Komplementarita	komplementární k mRNA	částečně komplementární k mRNA
Cílení	jeden cíl	více cílů (až 100 najednou)
Mechanismus genové regulace	endonukleotické štěpení mRNA	represe translace, degradace mRNA, endonukleolytické štěpení mRNA
Klinická aplikace	terapeutikum	terapeutikum, cílová molekula léčby, diagnostický nástroj a biomarker



Obr. 4. Působení siRNA a miR na genové úrovni Gene silencing of siRNA and miR (Lam et al., 2015)

## Nádorové buňky

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny mortality a morbidity v rozvinutých zemích. S věkem populace se incidence nádorových onemocnění zvyšuje. Rizikovými faktory je nejen prostředí a způsob života, ale nezanedbatelné působení mají i genetické vlivy.

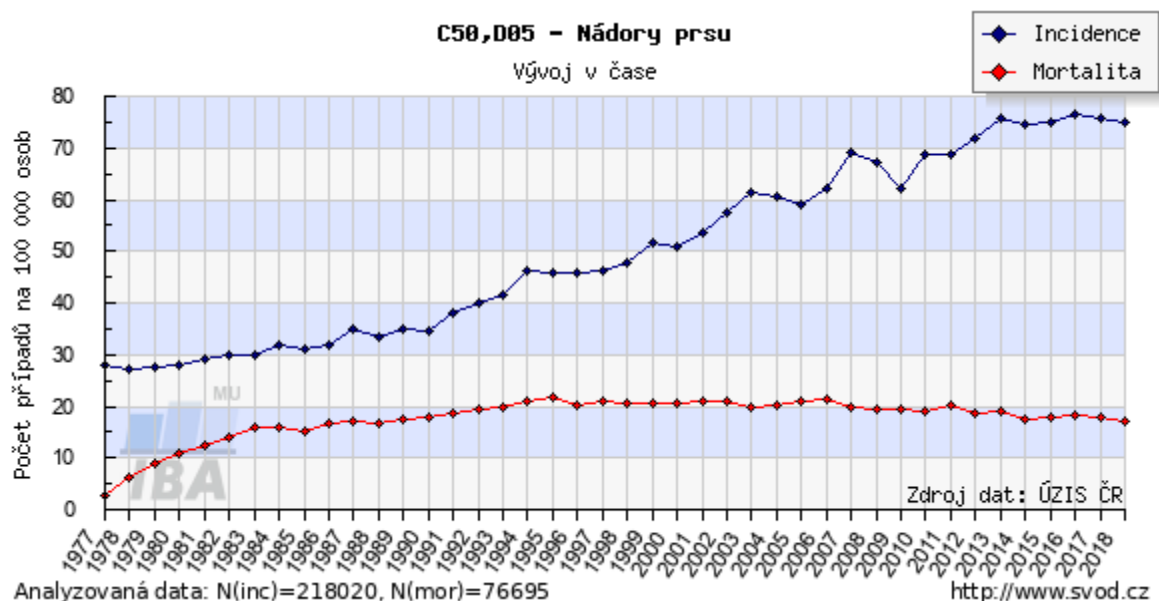
Vztah mezi imunitním systémem a nádorovým onemocněním je zkoumaný již po velmi dlouhou dobu a popsal ho před více než 150 lety Rudolf Virchow. Na počátku 20. století to byl Paul Erlich, který formuloval hypotézu, že prostřednictvím imunitního systému budou moci být zacíleny obranné mechanismy nebo léčebné prostředky přímo na nádorové buňky. Tato hypotéza postavila základy k praktickému přístupu, který je rozvíjen dodnes. Využití imunoterapeutických principů a přístupů je součástí nespočetného množství návrhů na protinádorovou léčbu a adjuvantní protinádorovou léčbu.

V genomu normální buňky jsou přítomny funkčně významné geny, kódující velmi významné bílkoviny, které jsou označovány jako protoonkogeny a jejich exprese je přesně regulovaná. Pokud dojde k poruše regulace exprese protoonkogenů, stávají se z nich **onkogeny**, kódující produkty, které silně narušují normální fyziologii organismu. Tělo se těmto procesům brání opravnými mechanismy a exprimuje tzv. antionkogeny. V případě, že je fungování antionkogenů narušeno, dochází k maligní transformaci buňky a nádorovému bujení v těle. Nádorové buňky prodělávají v těle vývoj v čase a v prostoru a tyto změny se odrážejí i v reakci imunitního systému. Pod vlivem nádorového mikroprostředí a imunitních reakcí jsou tělem nakonec selektovány buňky s největší proliferační a metabolickou aktivitou.

## Karcinom prsu

Podle WHO je karcinom prsu nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a podle Národního onkologického registru ČR představuje karcinom prsu taktéž nejčastější nádorové onemocnění u žen v České republice. Incidence nádoru prsu neustále stoupá ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)) a to také díky brzké diagnostice. Procento přežití u diagnostikovaných žen se liší hlavně vyspělostí země a přístupem k lékařské péči. Z celkového počtu úmrtí na světě představuje karcinom prsu 13 % (Bray et al., 2018). Podíl nově zachyceného metastatického karcinomu zůstává stejný (5-10 %). U metastatického karcinomu prsu se pětileté přežití zvýšilo na 26 %. Karcinom prsu se

nevyhýbá ani mužům, výskyt je však nízký (desítky případů ročně v ČR). Incidence tohoto nádorového onemocnění má celosvětově stoupající tendenci.



Graf 1. Incidence a mortalita nádorů prsu u žen, zdroj dat ÚZIS

Premaligní změny, které předchází vzniku nádoru jsou hyperplazie (duktální, lobulární nebo atypická), z nichž se vyvíjí neinvazivní karcinom in situ. Duktální karcinom vyrůstá z maligně transformovaných epitelových buněk vývodů, zatímco lobulární karcinom vyrůstá z epitelových buněk lalůček (lobulů). Posléze se karcinomy mění na invazivní. Diagnostikované léze v prsu dělí podle jejich rizikovosti pro vznik karcinomu na low-grade léze s nízkým maligním potenciálem a high-grade léze s vysokým maligním potenciálem. Oba typy mamárních lézí vznikají v terminální duktolobulární jednotce.

Mezi low-grade léze patří kolumnární léze, atypické léze, atypická duktální hyperplazie a lobulární neoplazie. Kolumnární a ploché epiteliální léze jsou pokládány za prekursorové léze s 2-5ti násobně vyšší rizikem vzniku karcinomu. Atypická duktální hyperplazie nemá všechny znaky duktálního karcinomu prsu in situ a považuje se za prekursor tohoto stavu. Přibližně u 20 % žen se rozvíjí invazivní karcinom. Lobulární intraepiteliální neoplazie charakteristická proliferací epitelu terminální duktolobulární jednotky a považuje se opět za prekursor lobulárního karcinomu in situ.

High-grade prekursorové léze jsou považovány za stadium předcházející invazivním high-grade karcinomům. Patří mezi ně mikroglandulární adenóza, atypická apokrinní hyperplazie, pleomorfní lobulární karcinom in situ a duktální karcinom in situ. Duktální karcinom in situ

je heterogenní skupina karcinomů s rozsáhlým spektrem genetických abnormalit a biologických vlastností. Duktální karcinom in situ nepřekračuje bazální membránu ductu, nešíří se do cévního a lymfatického řečiště, může se však šířit intraduktálně na velké vzdálenosti. Na mamografu se manifestuje mikrokalciifikacemi. Lobulární karcinom je častější u žen v produktivním věku nebo žen užívajících hormonální medikamenty. Nemá jasné ohrazení a netvoří mikrokalciifikace.

Při nádorovém onemocnění prsu se posuzuje rozsah onemocnění pomocí několika faktorů. Je jimi velikost nádoru, stav regionálních lymfatických uzlin, přítomnost vzdálených metastáz, věk pacientky a další prediktivní faktory. Mezi tyto další prediktivní faktory patří grading nádorových buněk (histopatologie), exprese hormonálních receptorů (estrogenové a progesteronové receptory), proliferační indexy a exprese onkoproteinu HER-2/neu. Podle těchto faktorů potom následuje terapie. Základem je chirurgická léčba a potom systémová protinádorová léčba (chemoterapie, radioterapie, hormonální terapie a biologická léčba). V některých případech je možná léčba v rámci klinických nebo experimentálních studií.

Rizikové faktory jsou hlavně genetické, hormonální a nutriční. Nádory prsu, které jsou zapříčiněny genetickou mutací se nazývají hereditární karcinomy a vyskytují se v 5-7 % a nejpočetnějšími jsou mutace BRCA1 a BRCA2 genů.

### Léčba karcinomu prsu

K systémové léčbě karcinomu prsu se používají tyto typy léčby: hormonální léčba, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie.

Při imunoterapii se spoléháme na to, že imunitní systém člověka proti nádorovým buňkám bojuje a snaží se je eliminovat. Nádor vytvoří zánět, který vede k angiogenezi a změně nádorového mikroprostředí. Do hlavních rolí se dostávají fagocytující buňky (NK buňky, mastocyty, dendritické buňky) a aktivace přirozené imunity. Pokud nedojde k eliminaci nádoru, dochází bohužel k selekci klonů nádorových buněk, které jsou schopné imunitnímu systému uniknout. Imunogenicita jednotlivých typů mamárního karcinomu se liší a toho využívá imunoterapie v prevenci i léčbě karcinomu prsu. V současné době jsou jako součást imunoterapie k dispozici protinádorové vakcíny, inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce a je možné využít i imunomodulačního účinku některých cytostatik a monoklonálních protilátek. Při kombinovaném podání se využívá synergického působení těchto terapií.

Protinádorové vakcíny se využívají v prevenci rekurence onemocnění (sekundární prevence) a kromě počátečního protinádorového účinku zprostředkovaného T<sub>C</sub> lymfocyty (cytotoxické T lymfocyty) mohou vést ke vzniku imunologické paměti (paměťové T a B lymfocyty). Stimulace lymfocytů může být proti jednomu nebo více antigenům pomocí živých nebo neživých vakcín. Neživé vakcíny obsahují antigen, adjuvans a živé vakcíny navíc živé buňky (dendritické buňky) nebo virové částice. U cytostatik se využívá imunomodulačního účinku, který je zprostředkován několika mechanismy – navození imunogenní smrti, senzitivace nádorových buněk k cytotoxickému účinku T<sub>C</sub> lymfocytů, selektivní inhibice Treg lymfocytů a nezralých myeloidních buněk a ovlivnění exprese agonistů a antagonistů kontrolních bodů imunitní reakce. Dále je využívána cílená léčba monoklonálními protilátkami a jejich imunomodulační působení. V tomto případě se jedná o aktivaci mechanismu buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách (tzv. ADCC antibody dependent cellular cytotoxicity) a cytotoxicity zprostředkované komplementem (CDC - complement dependent cytotoxicity). Takto působí známé biologické léčivo Herceptin (trastuzumab), jehož vytvoření byl jeden z klíčových objevů v léčbě metastazujícího karcinomu prsu a po němž následovala další léčiva podobné skupiny. Ačkoliv je k dispozici na trhu celá řada preparátů, žádná léčba dosud nemůže slíbit úplné vyléčení a stále se hledají nové a perspektivní metody léčby a adjuvantní léčby.

### Karcinom prsu v myším modelu

Při studiu karcinomu prsu se v současné době neobejdeme bez zvířecího modelu (studium *in vivo*). Nejčastěji používané modely jsou na myši (*Mus musculus*) a existuje jich celá řada, protože karcinom prsu je heterogenní onemocnění. Myší model karcinomu prsu se dá rozdělit na 3 skupiny (Sakamoto et al., 2015):

- 1) xenografní model nebo syngenní model
- 2) chemicky, virově nebo radiačně indukované modely
- 3) genetické modely (transgenní a knock-outy)

V naší práci se budeme věnovat xenografnímu modelu, vzhledem k jeho technické, ekonomické a časové dostupnosti. Klasický xenografní model spočívá v transplantaci dobře charakterizované linie lidského nebo myšího mamárního karcinomu do, pokud je to nutné, imunokompromitované myši.

## 4T1

4T1 model nádoru mléčné žlázy je transplantovatelná linie mamárního adenokarcinomu myši původně izolovaná Fredem Millerem a kolegy (Pulaski et al., 2001). Tento nádor roste u Balb/c myši a na jejich tkáňových buňkách. 4T1 nádorová linie je vysoce tumorogenní (nádor se vyvine u 100% inokulovaných myši) a invazivní a na rozdíl od většiny modelů dokáže spontánně metastazovat z primárního nádoru v mléčné žláze do vzdálených částí těla, jako jsou lymfatické uzliny, krev, játra, plíce, mozek a kosti. Je tedy používána např. k výzkumu metastatických genů. Tento model má několik nesporných výhod jako je snadná možnost transplantace do původní originálního místa výskytu (tzn. do mléčné žlázy) a svým způsobem rozsevu metastáz v organismu je velmi podobný lidskému nádoru prsu. Podobně jako některé typy lidského karcinomu prsu je linie myšního karcinomu mléčné žlázy 4T1 velmi slabě imunogenní, exprimuje adekvátní množství MHC I receptorů a nemá detekovatelné MHC II receptory, takže je dobrým cílem pro CD8<sup>+</sup> Tc lymfocyty (DuPre et al., 2007). Tato linie je velmi vhodná k testování nových protinádorových vakcín.

## Karcinom prsu a miR

Role miR v normální fyziologii mléčné žlázy nebyla ještě zcela prozkoumána. Některé studie ukazují na to, že se exprese miR v mléčné žláze mění v průběhu dospívání, dospělosti, březosti u zvířete a v době a po skončení laktace. Některé miR, které jsou asociovány s agresivním typem nádoru mléčné žlázy, jsou vysoce exprimovány také během dospívání a březosti, v době vysoké proliferační aktivity ductů a alveolů mléčné žlázy, což může naznačovat přímou souvislost s proliferací a růstem tkáně. Na druhé straně existují i určité miR, jejichž hladiny jsou nejvyšší v době snížení proliferace a remodelace prsní žlázy po skončení laktace. Při vývoji nádoru mléčné žlázy dochází k dysregulaci miR.

Exprese estrogenního receptoru (ER) je důležitý rozlišovací znak, podle kterého se řídí i typ léčby nádorového onemocnění prsu. Současné studie dokáží rozeznat typickou expresi miR a přítomnost ER receptoru. ER<sup>+</sup> nádory exprimují Let-7 a miR-342. ER<sup>-</sup> nádory exprimují **miR-135b** a miR-18 (Lowery et al, 2009). MiR-135b je klíčovou miR molekulou v naší práci. Mechanismus dysregulace většiny miR je podobný dysregulaci mRNA, které prochází

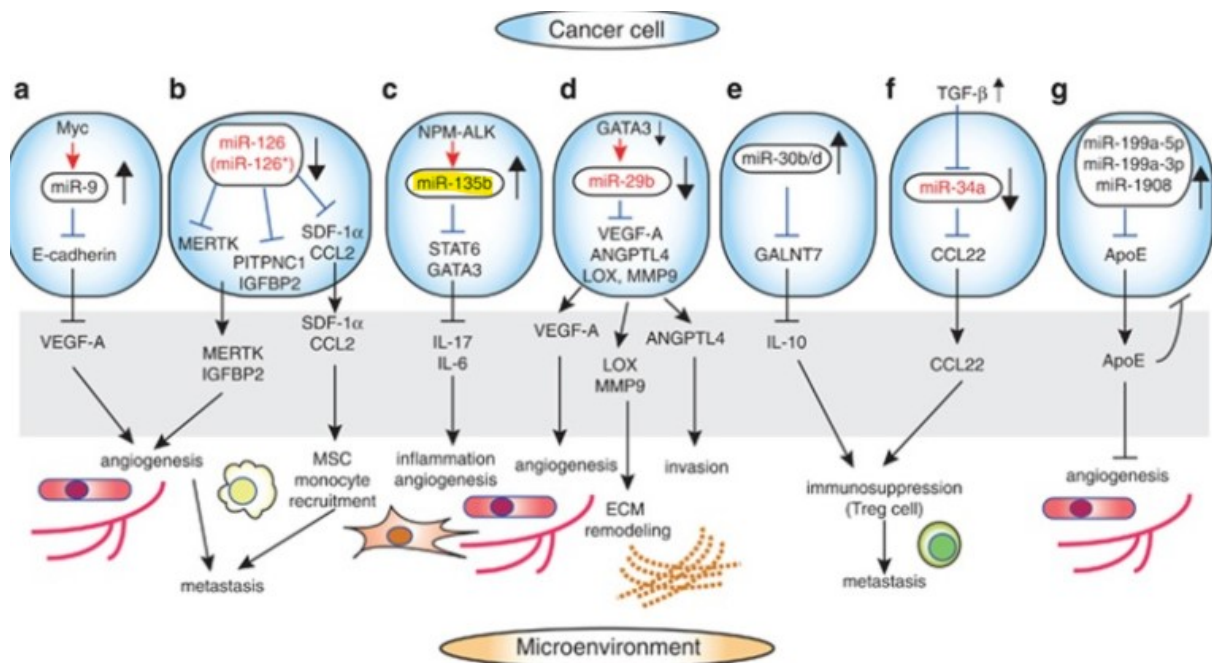


podobnou kontrolou transkripčních mechanismů a to právě díky stejné polymeráze (RNA Pol II). Po transkripci už se úprava miR liší a je zde mnoho kroků, kde může být úprava narušena nebo ovlivněna.

Protože miR mají významnou roli v regulaci onkogeneze, zdají se být i důležitým cílem pro ovlivnění nádorového růstu. Ovlivnění hladiny miR, které má vliv na onkogenezi je velkým příslibem v budoucí léčbě, která spočívá ve vnášení miR do nádorových buněk pomocí nejrůznějších nosičů (Hayward et al., 2016). Na druhou stranu specifické miR mají často v organismu i další role, které by regulací hladin miR mohly být alternovány.

## Nádorové prostředí a miR-135b

Změny exprese některých miR jsou součástí regulace imunofenotypu nádorových buněk a mohou mít také vliv na nádorové prostředí. Přímo miR-135b je zvýšeně exprimovaná v různých typech nádorových onemocnění a to např. u nádoru tlustého střeva nebo nádoru plic (Khatrı et al., 2013, Lin et al. 2013). Dále například u karcinomu slinivky, kde má vliv na migraci, invazi a přestup z epitelu do mezenchymu (Zhang et al., 2017). A v literatuře jsou popsány i případy zvýšené exprese u nádorů prsu u člověka (Lv et al., 2019), kde je zvýšená hladina této miR korelována s invazí a proliferací nádorových buněk. Publikace Matsuyama et al. 2011 ukázala na jasnou spojitost aktivace miR-135b signalizační dráhou STAT3 v typu lymfomu ALCL. Zároveň také bylo ukázáno, že exprese miR-135b má vliv na tvorbu Th17 fenotypu, což může být z důvodu cílení podobných regulátorů Th2 odpovědi STAT6 a GATA3 pomocí miR-135b (Suzuki et al., 2015, obr. 5).



Obr. 5 Regulace nádorového mikroprostředí pomocí miR. Změna v expresi různých typů miR může pomocí nejrůznějších mechanismů ovlivňovat progresi a růst nádorů. Převzato ze Suzuki et al., 2015

Podle další publikace Hua et al. 2016 zvýšené exprimování hladiny miR-135b se mohou podílet na progresi nádorového onemocnění a tvorbu metastáz.

## miR a regulace imunity

Hematopoéza u savců je proces, který je regulován geneticky a epigeneticky. Základem tvorby krevních buněk je kmenová buňka, která udržuje rovnováhu mezi neustálým obnovováním krevních buněk a diferenciací těchto buněk a dává vznik dalším typům buněk, progenitorům. Za různých okolností, což je třeba buněčný stres, stárnutí nebo zánět musí progenitorová buňka různě reagovat a produkovat další buňky, které budou schopné se na prostředí a danou situaci adaptovat a adekvátně na ní reagovat, čehož je docíleno mechanismy jako je regulace buněčného cyklu, proliferace, mobilizace kmenových buněk, autofágie, sekrece a adekvátní reakce na tvorbu cytokinů.

Právě během zánětu nebo buněčného stresu je regulace tvorby miR modifikována a tato dysregulace může vést k patologickým imunitním odpovědím, například autoimunitním poruchám nebo leukémií. Již je patrné, že ne pouze transkripční faktory ovlivňují osudy hematopoetických buněk a celý tento proces je komplexní. Několik různých miR může buď kooperovat nebo mít antagonické působení na určitý faktor a zároveň jedna miR může ovlivňovat více cílů na genové úrovni. V posledních letech se podařilo najít mnoho nových miR, které hrají roli ve vývoji imunitního systému a z toho důvodu se na ně obrací pozornost jako na cíle léčby při onemocněních, která jsou podmíněná imunitními funkcemi nebo v nich funkce imunity mají velký podíl.

## Regulace hematopoetické kmenových buněk

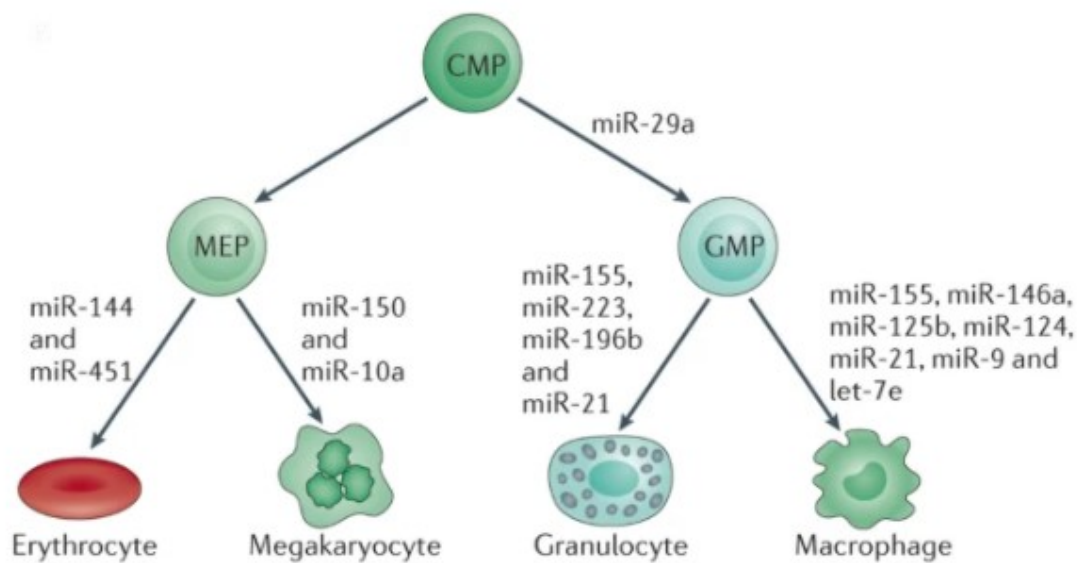
Hematopoetické buňky se nacházejí v kostní dřeni a jsou zodpovědné za neustálé dělení a obnovu krevních buněk a imunitních buněk. MiR má za normálních podmínek důležitou fyziologickou roli ve funkci hematopoetických buněk. Bylo dokázáno na zvířecím modelu, že při blokování proteinu 2 (zodpovědného za tvorbu RNA komplexu v jádře a následné miR biogeneze) následuje selhání krvetvorby hematopoetickými buňkami (Gruber et al., 2009). Například rodina miR-125b je velmi důležitá k zachování normální tvorby hematopoetických buněk a v případě transplantací je vynucená produkce této miR spojená se zlepšením funkcí hematopoetických buněk (O'Connell et al., 2010).

## Regulace přirozené imunity pomocí miR

MiR je nezbytnou součástí regulace imunitního systému přirozené imunity. Ovlivňuje přirozenou imunitu na úrovni několika hladin – produkce a aktivace cytokinů nebo chemokinů, exprese adhezivních nebo kostimulačních molekul, uvolnění exozómů a zpětná regulace imunitní homeostázy. Studie zaměřené na molekulární podstatu dějů odhalují to, že deregulace ve funkcích miR může vést k abnormální buněčné imunitní odpovědi způsobující různá autoimunitní nebo nádorové onemocnění. Studie ukazují, že miR hraje významnou roli v regulaci buněčného vývoje a funkce.

MiR jsou exprimovány buňkami přirozené imunity jako jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky, granulocyty a NK buňky. K regulaci funkce a diferenciaci makrofágů jsou důležité miR-155 a miR-146a (Turner et al., 2011). MiR-223 je zvýšeně exprimovaná během diferenciaci granulocytů a může dramaticky ovlivňovat jejich osud (O'Connell et al., 2011). Dále bylo například ukázáno, že myši, kterým chybí miR-150, neprodukují nebo mají sníženou produkci NK buněk (Bezman et al., 2011).

Obr. 6 - MiR regulují vývoj a funkci buněk přirozené imunity. Převzato Mehta and Baltimore, 2016. CMP běžný myeloidní progenitor, GMP progenitor granulocytů a monocytů, MEP progenitor megakaryocytů a erytrocytů.



Tab. 2 - Různé miR hrající roli v přirozené imunitě, převzato Yu et al. 2013

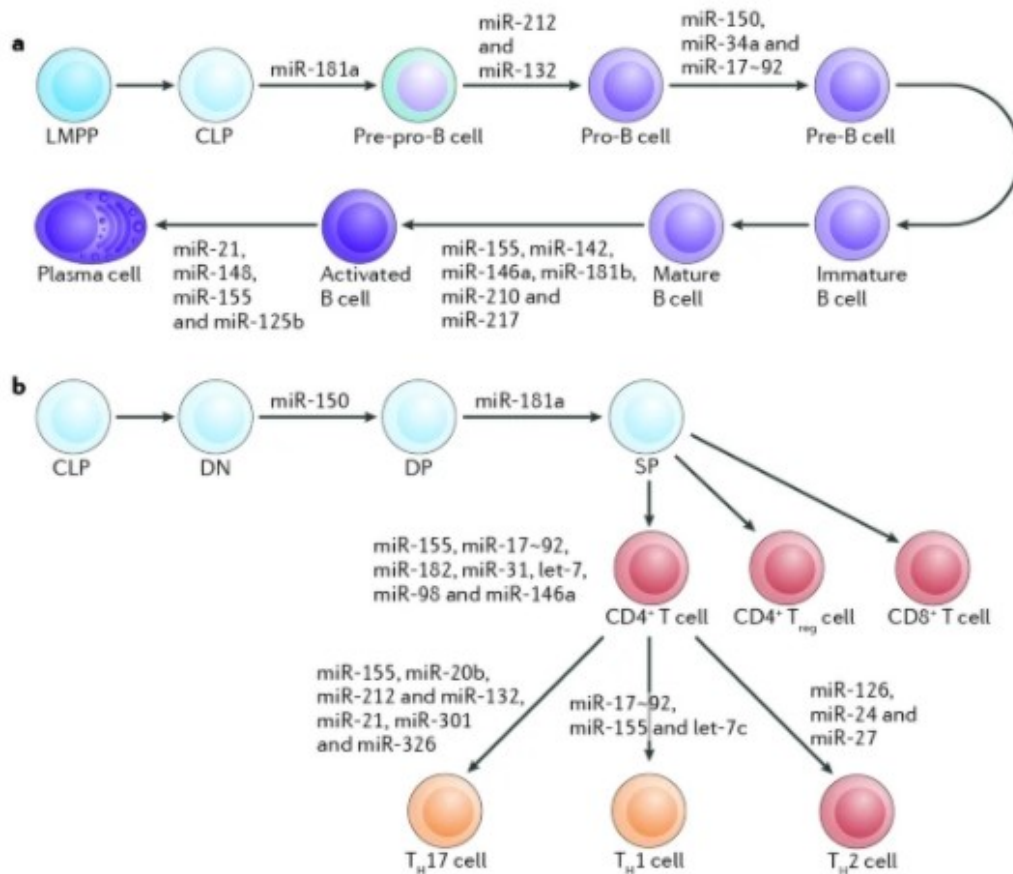
	<b>miRNAs</b>	<b>Cílový gen</b>
Makrofágy	miR-511-3p	MRC1
	miR-146a	TRAF6, IRAK1
	miR-27b	
	miR-9	NF- $\kappa$ B1
	miR-222, miR-339	ICAM-1
	miR-125b	TNF- $\alpha$
	miR-16	
	NK buňky	miR-378
miR-30e		PRF
miR-27a		PRF1 & GZMB
miR-30c-1		HMBOX1

### Regulace adaptivní imunity pomocí miR

Různé studie ukazují vliv miR na vývoj a diferenciaci T a B lymfocytů, což znamená, že defekty nebo chyby v regulaci miR mohou být spojovány s chorobami, které jsou podmíněny defektem ve vývoji a funkci T buněk nebo B buněk.

Například bylo doloženo, že exprese miR-181 může zvyšovat diferenciaci B buněk, bez vlivu na myeloidní buňky nebo T buňky (Chen et al., 2004), což bylo dokázáno studií, která byla současně první prací ukazující, že miR mohou modulovat vývoj imunitních buněk.

Obr. 7 - MiR ovlivňuje vývoj buněk adaptivní imunity, převzato z Mehta and Baltimore, 2016, a) vývoj a funkce B buněk, b) vývoj a funkce T buněk, CLP běžný lymfoidní progenitor, DN dvojitě negativní, DP dvojitě pozitivní, LMPP lymfoid-primed multipotentní progenitor, pre-B cell prekursor B buněk, pre-pro-B cell prekursor progenitorových B buněk, pro-B cell progenitor B buněk, SP single pozitivní



Jedna z prvních miR spojovaná s B buněčnou odpovědí je miR-155. MiR-155 přímo potlačuje AID, což je faktor (Activation induced deaminase), který je nezbytný k maturaci protilátek. Dysregulace AID může také vést k hematopoetickému nádorovému onemocnění (Okazaki et al. 2003).

Na vývoj T lymfocytů má vliv např. miR-21, která pomáhá v rámci Th17 diferenciace buněk cílením SMAD7, který je negativně reguluje TGF- $\beta$  signalizaci (Murugaiyan et al., 2015). Dalším zajímavým příkladem, tentokrát regulace funkce T lymfocytů pomocí miR, je vlastnost

miR-146a potlačující funkci Treg přímým zacílením na STAT (Lu et al., 2010) a zároveň funguje jako inhibitor odpovědi pomocí INF- $\gamma$  (Huffaker et al., 2012).

Tab. 3 Účast miR v adaptivní imunitě, dle Yu et al., 2013

		<b>miRNAs</b>	<b>Cílový gen</b>
B buňky	Pro B buňky	miR-34a	FOXP1
		miR-17~92	BIM
		miR-150	c-MYB
	Pre B buňky	miR-155	BIC
		miR-155	SHIP & C/EBP $\beta$
		miR-125b	LIN28A
	Nezralé B buňky	miR-15a, miR-16-1	
		miR-181a, miR-181b, miR-107, miR-424	PLAG1
	Naivní B buňky	miR-17-5p, miR-106a, miR-181b	
		miR-17-5p, miR-127	
		miR-17~92, miR-106a-363, miR-106b-25	
	Zralé B buňky	miR-155	PU.1
T buňky		<b>miR-135b</b>	FOXO1, STAT6 & GATA3
		miR-140-5p, miR-409-3p, miR-433-3p, miR-650	ULBP1
Dendritické buňky		miR-155, miR-146a, miR-125a-5p	
		miR-155	AGO2, AGO4
		miR-23b	NOTCH1
		miR-146a, miR-155, miR-132	
		miR-511	

## Patologie dysregulace miR

### Onkomiry a MiR nádorové supresory

V řadě studií, věnující se hematologickým patologiím a autoimunitním onemocněním zahrnující roztroušenou sklerózu, systémový lupus, reumatoidní artritidu, zánětlivé onemocnění střev nebo Sjögrenův syndrom, byl zjištěn významný vliv miR. Některé miR fungují jako tzv. onkomiry – jedná se o miR, která v případě vysoké exprese může vést k nádorovým změnám. Existují ale také miR, které mají tlumivé účinky na nádor.

### Nádorové onemocnění krve

Vliv miR na nádorové onemocnění krve nám dokumentuje příklad miR-28, která funguje jako nádorový supresor a její exprese je snížena během Burkittova lymfomu a non-Hodgkinově lymfomu (Schneider et al., 2014). Ale vůbec prvním modelem vlivu onkomirů na hematopoetické malignancie byl publikovaný v roce 2010 Medina et al. Uměle zvýšená exprese miR-21 vedla k vytvoření pre-B buněčného lymfomu a následné snížení hladiny miR-21 se projevilo jako regrese maligního onemocnění.

### Autoimunitní choroby

Již mnoho studií prokázalo změnu v expresi miR u autoimunitních onemocnění. Přesný důvod a mechanismus těchto změn zatím není úplně objasněn. Některé z miR měly vliv na regulaci prozánětlivých Th17 buněk, které zrychlují progresi autoimunitních onemocnění, např. na modelu roztroušené sklerózy. Takto fungují různé miR, například miR-21 (Murugaiyan et al., 2015). I další výzkumy nám ukazují, že inhibováním prozánětlivých miR by se mohl být jeden z léčebných přístupů a to alespoň v aditivních terapiích.

## Role miR-135b v imunitních funkcích

Role miR-135b v imunitních funkcích se zdá velmi komplexní. Dokázán je vliv na regulaci T lymfocytů a to jmenovitě na aktivaci T lymfocytů a prezentaci antigenů na dendritických buňkách, což má za následek působení na další druhy imunitních buněk. MiR-135b negativně



ovlivňuje expresi Th2 lymfocytárních genů STAT6 a GATA3 (Matsuyama et al., 2011). V tom samém článku je popisována možnost inhibice miR-135b, která *in vivo* indukuje angiogenezi.

# Cíle práce

V naší práci jsme si vytyčili několik dílčích cílů k posouzení budoucího využití nanodiamantových částic jako cílených nosičů terapeutik v nádorovém mikroprostředí.

1. Zavedení vhodného nádorového modelu *in vitro/ex vivo/in vivo*
2. Výběr a ověření vhodné efektorové molekuly pro genovou terapii
3. Vytvoření nanodiamantového systému s vybranou efektorovou molekulou
4. Definice imunitní odpovědi na aplikované nanočásticové systémy

# Seznam citované literatury

Alkahtani, M. H., F. Alghannam, L. Jiang, A. A. Rampersaud, R. Brick, C. L. Gomes, M. O. Scully and P. R. Hemmer (2018). "Fluorescent nanodiamonds for luminescent thermometry in the biological transparency window." *Opt Lett* 43(14): 3317-3320.

Bakowicz, K., & Mitura, S. (2002). Biocompatibility of NCD. *Journal of Wide Bandgap Materials*, 9(4), 261–272. doi:10.1106/152451102024429

Balasubramanian, G., I. Y. Chan, R. Kolesov, M. Al-Hmoud, J. Tisler, C. Shin, C. Kim, A. Wojcik, P. R. Hemmer, A. Krueger, T. Hanke, A. Leitenstorfer, R. Bratschitsch, F. Jelezko and J. Wrachtrup (2008). "Nanoscale imaging magnetometry with diamond spins under ambient conditions." *Nature* 455(7213): 648-651.

Benz, F., S. Roy, C. Trautwein, C. Roderburg and T. Luedde (2016). "Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis." *Int J Mol Sci* 17(1).

Bezman, N. A., T. Chakraborty, T. Bender and L. L. Lanier (2011). "miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells." *J Exp Med* 208(13): 2717-2731.

Boraschi, D., A. Alijagic, M. Auguste, F. Barbero, E. Ferrari, S. Hernadi, C. Mayall, S. Michelini, N. I. Navarro Pacheco, A. Prinelli, E. Swart, B. J. Swartzwelter, N. G. Bastús, L. Canesi, D. Drobne, A. Duschl, M. A. Ewart, J. Horejs-Hoeck, P. Italiani, B. Kemmerling, P. Kille, P. Prochazkova, V. F. Puentes, D. J. Spurgeon, C. Svendsen, C. J. Wilde and A. Pinsino (2020). "Addressing Nanomaterial Immunosafety by Evaluating Innate Immunity across Living Species." *Small* 16(21): e2000598.

Bovenkerk, H. P., Bundy F. P., Hall H. T., Strong H. M., and Wentorf R. H., Preparation of diamond. *Nature*, 184(4693):1094–1098, oct 1959

Bradac, C., T. Gaebel, N. Naidoo, M. J. Sellars, J. Twamley, L. J. Brown, A. S. Barnard, T. Plakhotnik, A. V. Zvyagin and J. R. Rabeau (2010). "Observation and control of blinking nitrogen-vacancy centres in discrete nanodiamonds." *Nat Nanotechnol* 5(5): 345-349.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424.

Bundy F. P., Hall H. T., Strong H. M., and Wentorf R. H., Man-made diamonds. *Nature*, 176(4471):51–55, jul 1955.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15524-15529.

Chang, L. Y., E. Osawa and A. S. Barnard (2011). "Confirmation of the electrostatic self-assembly of nanodiamonds." *Nanoscale* 3(3): 958-962.

Chang, Y. R., H. Y. Lee, K. Chen, C. C. Chang, D. S. Tsai, C. C. Fu, T. S. Lim, Y. K. Tzeng, C. Y. Fang, C. C. Han, H. C. Chang and W. Fann (2008). "Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds." *Nat Nanotechnol* 3(5): 284-288.

Chang, H. C., Hsiao W.W., Su M.C., *Fluorescent Nanodiamonds*, 2019 John Wiley & Sons Ltd

Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish and D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* 303(5654): 83-86.

Chipaux, M., K. J. van der Laan, S. R. Hemelaar, M. Hasani, T. Zheng and R. Schirhagl (2018). "Nanodiamonds and Their Applications in Cells." *Small* 14(24): e1704263.

Choy K., Chemical vapour deposition of coatings. *Progress in Materials Science*, 48(2):57–170, 2003.

Chow, E. K., X. Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, A. Goga and D. Ho (2011). "Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment." *Sci Transl Med* 3(73): 73ra21.

Chow, E. K., X. Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, A. Goga and D. Ho (2011). "Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment." *Sci Transl Med* 3(73): 73ra21.

Danilenko, V., et al. "On the history of the discovery of nanodiamond synthesis" *Physics of the Solid State* 46.4 (2004): 595-599.

Davies G. and Hamer M.F.. Optical studies of the 1.945 eV vibronic band in diamond. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 348(1653):285–298, feb 1976.

Dolmatov V. Y., Yurev G.S., Myllymaki V., and Korolev K.M., Why detonation nanodiamonds are small. *Journal of Superhard Materials*, 35(2):77–82, mar 2013

Downward, J. (2004). "RNA interference." *BMJ* 328(7450): 1245-1248.

DuPré, S. A., D. Redelman and K. W. Hunter (2007). "The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci." *Int J Exp Pathol* 88(5): 351-360.

Eldawud, R., M. Reitzig, J. Opitz, Y. Rojansakul, W. Jiang, S. Nangia and C. Z. Dinu (2016). "Combinatorial approaches to evaluate nanodiamond uptake and induced cellular fate." *Nanotechnology* 27(8): 085107.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.

Fu, C. C., H. Y. Lee, K. Chen, T. S. Lim, H. Y. Wu, P. K. Lin, P. K. Wei, P. H. Tsao, H. C. Chang and W. Fann (2007). "Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 727-732.

Grant, Barth & Sato, Miyuki. (2006). Intracellular trafficking. *WormBook : the online review of C. elegans biology*. 1-9. 10.1895/wormbook.1.77.1.

Gruber, J. J., D. S. Zatechka, L. R. Sabin, J. Yong, J. J. Lum, M. Kong, W. X. Zong, Z. Zhang, C. K. Lau, J. Rawlings, S. Cherry, J. N. Ihle, G. Dreyfuss and C. B. Thompson (2009). "Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation." *Cell* 138(2): 328-339.

Hartmann, M., P. Betz, Y. Sun, S. N. Gorb, T. K. Lindhorst and A. Krueger (2012). "Saccharide-modified nanodiamond conjugates for the efficient detection and removal of pathogenic bacteria." *Chemistry* 18(21): 6485-6492.

Hayward, S. L., D. M. Francis, P. Kholmatov and S. Kidambi (2016). "Targeted Delivery of MicroRNA125a-5p by Engineered Lipid Nanoparticles for the Treatment of HER2 Positive Metastatic Breast Cancer." *J Biomed Nanotechnol* 12(3): 554-568.

Hua, K., J. Jin, J. Zhao, J. Song, H. Song, D. Li, N. Maskey, B. Zhao, C. Wu, H. Xu and L. Fang (2016). "miR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2." *Int J Oncol* 48(5): 1997-2006.

Huang, H., E. Pierstorff, E. Osawa and D. Ho (2008). "Protein-mediated assembly of nanodiamond hydrogels into a biocompatible and biofunctional multilayer nanofilm." *ACS Nano* 2(2): 203-212.

Huffaker, T. B., R. Hu, M. C. Runtsch, E. Bake, X. Chen, J. Zhao, J. L. Round, D. Baltimore and R. M. O'Connell (2012). "Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity." *Cell Rep* 2(6): 1697-1709.

Jagot, F. and N. Davoust (2016). "Is It worth Considering Circulating microRNAs in Multiple Sclerosis?" *Front Immunol* 7: 129.

Jairajpuri, D. S. and W. Y. Almawi (2016). "MicroRNA expression pattern in pre-eclampsia (Review)." *Mol Med Rep* 13(3): 2351-2358.

Jelezko F and Wrachtrup J. Single defect centres in diamond: A review. *physica status solidi (a)*, 203(13):3207–3225, oct 2006.

Khatri, R. and S. Subramanian (2013). "MicroRNA-135b and Its Circuitry Networks as Potential Therapeutic Targets in Colon Cancer." *Front Oncol* 3: 268.

Kichukova, T. M., N. T. Popov, H. Y. Ivanov and T. I. Vachev (2015). "Circulating microRNAs as a Novel Class of Potential Diagnostic Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders." *Folia Med (Plovdiv)* 57(3-4): 159-172.

Kim, H. J., K. Zhang, L. Moore and D. Ho (2014). "Diamond nanogel-embedded contact lenses mediate lysozyme-dependent therapeutic release." *ACS Nano* 8(3): 2998-3005.

- Kim, S. H., S. Y. Lee, Y. M. Lee and Y. K. Lee (2015). "MicroRNAs as biomarkers for dental diseases." *Singapore Dent J* 36: 18-22.
- Křivohlavá, R., E. Neuhöferová, K. Q. Jakobsen and V. Benson (2019). "Knockdown of microRNA-135b in Mammary Carcinoma by Targeted Nanodiamonds: Potentials and Pitfalls of *In Vivo* Applications." *Nanomaterials (Basel)* 9(6).
- Krützfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'." *Nature* 438(7068): 685-689.
- Kumari, S., M. K. Singh, S. K. Singh, J. J. Grácio and D. Dash (2014). "Nanodiamonds activate blood platelets and induce thromboembolism." *Nanomedicine (Lond)* 9(3): 427-440.
- Lam, J. K., M. Y. Chow, Y. Zhang and S. W. Leung (2015). "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing." *Mol Ther Nucleic Acids* 4: e252.
- Lam, R., M. Chen, E. Pierstorff, H. Huang, E. Osawa and D. Ho (2008). "Nanodiamond-embedded microfilm devices for localized chemotherapeutic elution." *ACS Nano* 2(10): 2095-2102.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-854.
- Li, J., Y. Zhu, W. Li, X. Zhang, Y. Peng and Q. Huang (2010). "Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug." *Biomaterials* 31(32): 8410-8418.
- Li, X., X. Bao and R. Wang (2016). "Neurogenesis-based epigenetic therapeutics for Alzheimer's disease (Review)." *Mol Med Rep* 14(2): 1043-1053.
- Lin, C. W., Y. L. Chang, Y. C. Chang, J. C. Lin, C. C. Chen, S. H. Pan, C. T. Wu, H. Y. Chen, S. C. Yang, T. M. Hong and P. C. Yang (2013). "MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1." *Nat Commun* 4: 1877.
- Lindsay, C. R. and L. C. Edelstein (2016). "MicroRNAs in Platelet Physiology and Function." *Semin Thromb Hemost* 42(3): 215-222.

Liu, K. K., C. C. Wang, C. L. Cheng and J. I. Chao (2009). "Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells." *Biomaterials* 30(26): 4249-4259.

Liu, W., Z. Niu, Q. Li, R. T. Pang, P. C. Chiu and W. S. Yeung (2016). "MicroRNA and Embryo Implantation." *Am J Reprod Immunol* 75(3): 263-271.

Lowery, A. J., N. Miller, A. Devaney, R. E. McNeill, P. A. Davoren, C. Lemetre, V. Benes, S. Schmidt, J. Blake, G. Ball and M. J. Kerin (2009). "MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer." *Breast Cancer Res* 11(3): R27.

Lu, L. F., M. P. Boldin, A. Chaudhry, L. L. Lin, K. D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore and A. Y. Rudensky (2010). "Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses." *Cell* 142(6): 914-929.

Lv, Z. D., H. N. Xin, Z. C. Yang, W. J. Wang, J. J. Dong, L. Y. Jin and F. N. Li (2019). "miR-135b promotes proliferation and metastasis by targeting APC in triple-negative breast cancer." *J Cell Physiol* 234(7): 10819-10826.

Magrez, A., S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller and L. Forró (2006). "Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials." *Nano Lett* 6(6): 1121-1125.

May P.W., Diamond thin films: a 21st-century material. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 358(1766):473–495, jan 2000.

Manus, L. M., D. J. Mastarone, E. A. Waters, X. Q. Zhang, E. A. Schultz-Sikma, K. W. Macrenaris, D. Ho and T. J. Meade (2010). "Gd(III)-nanodiamond conjugates for MRI contrast enhancement." *Nano Lett* 10(2): 484-489.

Marí-Alexandre, J., D. Sánchez-Izquierdo, J. Gilabert-Estellés, M. Barceló-Molina, A. Braza-Boïls and J. Sandoval (2016). "miRNAs Regulation and Its Role as Biomarkers in Endometriosis." *Int J Mol Sci* 17(1).



Matsuyama, H., H. I. Suzuki, H. Nishimori, M. Noguchi, T. Yao, N. Komatsu, H. Mano, K. Sugimoto and K. Miyazono (2011). "miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma." *Blood* 118(26): 6881-6892.

Medina, P. P., M. Nolde and F. J. Slack (2010). "OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma." *Nature* 467(7311): 86-90.

Mehta, A. and D. Baltimore (2016). "MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic." *Nat Rev Immunol* 16(5): 279-294.

Mohan, N., C. S. Chen, H. H. Hsieh, Y. C. Wu and H. C. Chang (2010). "*In vivo* imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*." *Nano Lett* 10(9): 3692-3699.

Moore, L. K., E. K. Chow, E. Osawa, J. M. Bishop and D. Ho (2013). "Diamond-lipid hybrids enhance chemotherapeutic tolerance and mediate tumor regression." *Adv Mater* 25(26): 3532-3541.

Moore, L. K., E. K. Chow, E. Osawa, J. M. Bishop and D. Ho (2013). "Diamond-lipid hybrids enhance chemotherapeutic tolerance and mediate tumor regression." *Adv Mater* 25(26): 3532-3541.

Murugaiyan, G., A. P. da Cunha, A. K. Ajay, N. Joller, L. P. Garo, S. Kumaradevan, N. Yosef, V. S. Vaidya and H. L. Weiner (2015). "MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Clin Invest* 125(3): 1069-1080.

Ni, J. S., Y. Li, W. Yue, B. Liu and K. Li (2020). "Nanoparticle-based Cell Trackers for Biomedical Applications." *Theranostics* 10(4): 1923-1947.

O'Connell, R. M., A. A. Chaudhuri, D. S. Rao, W. S. Gibson, A. B. Balazs and D. Baltimore (2010). "MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14235-14240.

O'Connell, R. M., A. A. Chaudhuri, D. S. Rao, W. S. Gibson, A. B. Balazs and D. Baltimore (2010). "MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32): 14235-14240.

Okazaki, I. M., H. Hiai, N. Kakazu, S. Yamada, M. Muramatsu, K. Kinoshita and T. Honjo (2003). "Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis." *J Exp Med* 197(9): 1173-1181.

Petráková, V., Nesládek, M., Taylor, A., Fendrych, F., Cígler, P., Ledvina, M., Vacík, J., Štursa, J. and Kučka, J. (2011), Luminescence properties of engineered nitrogen vacancy centers in a close surface proximity. *Phys. Status Solidi A*, 208: 2051-2056. doi:10.1002/pssa.201100035

Petrakova, V., I. Rehor, J. Stursa, M. Ledvina, M. Nesladek and P. Cigler (2015). "Charge-sensitive fluorescent nanosensors created from nanodiamonds." *Nanoscale* 7(29): 12307-12311.

Pulaski B.A., Ostrand-Rosenberg S.. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 20:Unit 20.2. doi: 10.1002/0471142735.im2002s39. PMID: 18432775.

Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S, Nanodiamonds with novel properties: A biological study, *Diamond and Related Materials*, Volume 16, Issue 12, 2007, 2124-2128, <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2007.07.025>

Rojas, S., J. D. Gispert, R. Martín, S. Abad, C. Menchón, D. Pareto, V. M. Víctor, M. Alvaro, H. García and J. R. Herance (2011). "Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. *In vivo* studies based on 18F radionuclide emission." *ACS Nano* 5(7): 5552-5559.

Sakamoto, K., J. W. Schmidt and K. U. Wagner (2015). "Mouse models of breast cancer." *Methods Mol Biol* 1267: 47-71.

Schneider, C., M. Setty, A. B. Holmes, R. L. Maute, C. S. Leslie, L. Mussolin, A. Rosolen, R. Dalla-Favera and K. Basso (2014). "MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(22): 8185-8190.

Schrand A, Ciftan Hens S.A., and Shenderova O. Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications. *Critical Revs. in Solid State & Mat. Sc.*, 34(1):18–74, jan 2009.

Šimková V., Freislebenová H., Neuhöferová E., Petráková V., Amini A., Benson V. Coated nanodiamonds interact with tubulin beta-III negative cells of adult brain tissue. *Biointerphases*. 2020 Dec 3;15(6):061009. doi: 10.1116/6.0000525. PMID: 33272020.

Suliman, S., Z. Xing, X. Wu, Y. Xue, T. O. Pedersen, Y. Sun, A. P. Døskeland, J. Nickel, T. Waag, H. Lygre, A. Finne-Wistrand, D. Steinmüller-Nethl, A. Krueger and K. Mustafa (2015). "Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques *in vitro* and *in vivo*." *J Control Release* 197: 148-157.

Sun, M., X. Zhou, L. Chen, S. Huang, V. Leung, N. Wu, H. Pan, W. Zhen, W. Lu and S. Peng (2016). "The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis." *Biomed Res Int* 2016: 1652417.

Suzuki, H. I., A. Katsura, H. Matsuyama and K. Miyazono (2015). "MicroRNA regulons in tumor microenvironment." *Oncogene* 34(24): 3085-3094.

Tinwala, H. and S. Wairkar (2019). "Production, surface modification and biomedical applications of nanodiamonds: A sparkling tool for theranostics." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 97: 913-931.

Tsai, L. W., Y. C. Lin, E. Perevedentseva, A. Lugovtsov, A. Priezzhev and C. L. Cheng (2016). "Nanodiamonds for Medical Applications: Interaction with Blood *in Vitro* and *in Vivo*." *Int J Mol Sci* 17(7).

Turner, M. L., F. M. Schnorfeil and T. Brocker (2011). "MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function." *J Immunol* 187(8): 3911-3917.

Vaijayanthimala, V. and H. C. Chang (2009). "Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications." *Nanomedicine (Lond)* 4(1): 47-55.

Vaijayanthimala, V., Y. K. Tzeng, H. C. Chang and C. L. Li (2009). "The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake." *Nanotechnology* 20(42): 425103.

van der Laan, K., M. Hasani, T. Zheng and R. Schirhagl (2018). "Nanodiamonds for *In Vivo* Applications." *Small* 14(19): e1703838.

van der Laan, K., M. Hasani, T. Zheng and R. Schirhagl (2018). "Nanodiamonds for *In Vivo* Applications." *Small* 14(19): e1703838.

Wang, H., J. Wang, X. Deng, H. Sun, Z. Shi, Z. Gu, Y. Liu and Y. Zhao (2004). "Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice." *J Nanosci Nanotechnol* 4(8): 1019-1024.

Wang, X., X. C. Low, W. Hou, L. N. Abdullah, T. B. Toh, M. Mohd Abdul Rashid, D. Ho and E. K. Chow (2014). "Epirubicin-adsorbed nanodiamonds kill chemoresistant hepatic cancer stem cells." *ACS Nano* 8(12): 12151-12166.

Wang, X., X. C. Low, W. Hou, L. N. Abdullah, T. B. Toh, M. Mohd Abdul Rashid, D. Ho and E. K. Chow (2014). "Epirubicin-adsorbed nanodiamonds kill chemoresistant hepatic cancer stem cells." *ACS Nano* 8(12): 12151-12166.

Xin, H., D. Jiang, Z. Lü, S. Sun, J. Kong and F. Li (2015). "[Effect of miRNA-135b on proliferation, invasion and migration of triple-negative breast cancer by targeting APC]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 95(30): 2474-2477.

Xing, Y., W. Xiong, L. Zhu, E. Osawa, S. Hussin and L. Dai (2011). "DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds." *ACS Nano* 5(3): 2376-2384.

Yu, H. W., D. M. Sze and W. C. Cho (2013). "MicroRNAs Involved in Anti-Tumour Immunity." *Int J Mol Sci* 14(3): 5587-5607.

Yuan Y, Chen Y, Liu J-H, Wang H, Liu Y (2009) Biodistribution and fate of nanodiamonds *in vivo*. *Diam Relat Mater* 18:95–100. doi:10.1016/j.diamond.2008.10.031

Yuan Y., Wang X., Jia G., Liu J., Wang T., Gu Y., Yang S., Zhen S., Wang H., Liu Y., Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice, *Diamond and Related Materials*, Volume 19, Issue 4, 2010, 291-299, <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2009.11.022>

Zhang, X., J. Yin, C. Kang, J. Li, Y. Zhu, W. Li, Q. Huang and Z. Zhu (2010). "Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation." *Toxicol Lett* 198(2): 237-243.

Zhang, X. Q., R. Lam, X. Xu, E. K. Chow, H. J. Kim and D. Ho (2011). "Multimodal nanodiamond drug delivery carriers for selective targeting, imaging, and enhanced chemotherapeutic efficacy." *Adv Mater* 23(41): 4770-4775.

Zhang, Z., X. Che, N. Yang, Z. Bai, Y. Wu, L. Zhao and H. Pei (2017). "miR-135b-5p Promotes migration, invasion and EMT of pancreatic cancer cells by targeting NR3C2." *Biomed Pharmacother* 96: 1341-1348.

Zhang X., Hu W., Li J., Tao L., Wei Y., A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond, *Toxicology Research*, Volume 1, Issue 1, July 2012, Pages 62–68, <https://doi.org/10.1039/c2tx20006f>

Zhu, Y., J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, Y. Zhao, C. Fan and Q. Huang (2012). "The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems." *Theranostics* 2(3): 302-312.

# Publikace

Publikace je součástí přílohy:

**Křivohlavá, R.**, E. Neuhöferová, K. Q. Jakobsen and V. Benson (2019). "Knockdown of microRNA-135b in Mammary Carcinoma by Targeted Nanodiamonds: Potentials and Pitfalls of *In Vivo* Applications." *Nanomaterials (Basel)* 9(6).

Publikace s podobnou tématikou:

Lukowski, S., E. Neuhoferova, M. Kinderman, **R. Krivohlava**, A. Mineva, V. Petrakova and V. Benson (2018). "Fluorescent Nanodiamonds are Efficient, Easy-to-Use Cyto-Compatible Vehicles for Monitored Delivery of Non-Coding Regulatory RNAs." *J Biomed Nanotechnol* 14(5): 946-958.

Další publikace nesouvisející s tématem:

**Křivohlavá, R.**, V. Grobárová, E. Neuhöferová, A. Fišerová and V. Benson (2018). "Interaction of colon cancer cells with glycoconjugates triggers complex changes in gene expression, glucose transporters and cell invasion." *Mol Med Rep* 17(4): 5508-5517.

**Křivohlavá R.**, Cytomegalovirus a kojení, *Neonatologické listy* 2, 24/2018

**Křivohlavá, R.** (2015). "Používání šidítka z pohledu laktační poradkyně." *Pediatrics for Practice* 16(6): 423-426.

Kaňková, S., J. Sulc, **R. Křivohlavá**, A. Kuběna and J. Flegr (2012). "Slower postnatal motor development in infants of mothers with latent toxoplasmosis during the first 18 months of life." *Early Hum Dev* 88(11): 879-884

Hulíková, K., V. Grobárová, **R. Křivohlavá** and A. Fišerová (2010). "Antitumor activity of N-acetyl-D-glucosamine-substituted glycoconjugates and combined therapy with keyhole limpet hemocyanin in B16F10 mouse melanoma model." *Folia Microbiol (Praha)* 55(5): 528-532.

Lindová, J., A. A. Kubena, H. Sturcová, **R. Krivohlavá**, M. Novotná, A. Rubesová, J. Havlíček, P. Kodym and J. Flegr (2010). "Pattern of money allocation in experimental games supports the stress hypothesis of gender differences in *Toxoplasma gondii*-induced behavioural changes." *Folia Parasitol (Praha)* 57(2): 136-142.

Kanková S, Kodym P, Frynta D, **Vavrinová R**, Kubena A, Flegr J. Influence of latent toxoplasmosis on the secondary sex ratio in mice. *Parasitology*. 2007 Nov;134(Pt 12):1709-17