Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

PATNÁCT LET SPOLUPRÁCE RADIOCHEMICKÉ LABORATOŘE ÚSTAVU MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY A 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY

Jan Kučka[a], Jana Humajová[c], Miroslav Vetrík[a], Jiří Pánek[a], Martin Hrubý[a], Marie Zadinová[c], Pavla Francová[b], Luděk Šefc[b] a Pavla Poučková[c]

[a] Ústav makromolekulární chemie AV ČR v.v.i., Heyrovského nám. 2/1888, 162 00 Praha 6, [b] Centrum pokročilého preklinického výzkumu (CAPI), 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Salmovská 3, 120 00 Praha 2, [c] Ústav biofyziky a informatiky, 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Salmovská 1, 120 00 Praha 2, Česká republika
jkucka@centrum.cz

Došlo 6.10.25, přijato 20.10.25.

Radiochemická laboratoř Ústavu makromolekulární chemie AV ČR vznikla roku 2009 s cílem rozvíjet syntézu a charakterizaci radioaktivně značených polymerů a nanočástic. Od počátku se ukázala nezbytnost úzké spolupráce s biologickými a medicínskými pracovišti 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Tento článek shrnuje patnáctiletou spolupráci od prvních pokusů na Ústavu biofyziky a informatiky až po současnou éru Centra pokročilého preklinického zobrazování (CAPI). Výsledkem jsou společné publikace, projekty a patenty s přesahem do medicíny. Text dále uvádí přehled technického vybavení, praktických požadavků na *in vivo* experimenty a ekonomických aspektů preklinického výzkumu.

Klíčová slova: radiofarmaka, radioaktivně značené sloučeniny, biodistribuce, biologické testování, zobrazovací metody

1. Úvod

Radiochemická laboratoř Ústavu makromolekulární chemie AV ČR (ÚMCH) byla založena v roce 2009 jako specializované pracoviště zaměřené na syntézu a charakterizaci radioaktivně značených polymerů, nanočástic a peptidů[1–6]; dále na vývoj radioznačených nanogelů[7] a CT-kontrastních (CT – výpočetní tomografie, angl. Computed Tomography) biokompatibilních gelů[8]. Od počátku byla zřejmá nutnost spolupráce s biologickými pracovišti, a proto byly navázány úzké vazby na 1. lékařskou fakultu Univerzity Karlovy (1. LF UK). Článek shrnuje 15 let spolupráce mezi Radiochemickou laboratoří ÚMCH a 1. LF UK — od počátečních kontaktů s Ústavem biofyziky přes vývoj léčiv na hemochromatózu a Wilsonovu chorobu, diagnostiku i terapii nádorů, až po současnou éru spolupráce s Centrem pokročilého preklinického zobrazování (CAPI).

2. Historie spolupráce

Vznik radiochemické laboratoře ÚMCH v roce 2009 umožnil využívat radionuklidy k experimentálnímu sledování polymerních nosičů a nanočástic vyvíjených na ÚMCH v biologických systémech. Byla navázána spolupráce s Ústavem biofyziky 1. LF UK, vedeným prof. MUDr. RNDr. Jiřím Benešem, CSc., kdy klíčovou roli sehrála doc. RNDr. Pavla Poučková, CSc., která otevřela cestu k biologickému testování. Pro efektivní spolupráci byla zásadní i role RNDr. Marie Zadinové, jež tým naučila manipulaci s laboratorními zvířaty a metody aplikace léčiv. Toto období představovalo „učební fázi“ spolupráce, během níž se vyvinuly základní metodiky biologického testování radioaktivních polymerů. Prvními z testovaných polymerů *in vivo* byly termoresponzivní polymery značené ^{131}I, které se ve formě roztoku aplikovaly do nádorů (karcinom prostaty, linie PC3, cit.[1]).

Testovaný poly(*N*-isopropylakrylamid) (PNIPAM) patří mezi termoresponzivní polymery, jejichž LCST (dolní kritická rozpouštěcí teplota, lower critical solution temperature) leží mezi laboratorní a tělesnou teplotou. Při přechodu z laboratorní teploty na teplotu lidského těla tak dojde k jeho fázové separaci z roztoku. Při podání *in vivo* se roztok polymeru rychle vysráží na hydrofobní gel, což umožňuje lokální retenci radioaktivní látky (depo), které je pak zvolna fyzikálně bioerodovatelné[1]. V této studii byl PNIPAM kovalentně funkcionalizován pro radiojodaci (značení ^{131}I, β, γ-zářič, $t_{1/2}$ = 8,02 dne). Funkcionalizace spočívala v kopolymeraci s *N*-methakroyl-L-tyrosinamidem (<1 mol %) umožňující elektrofilní radiojodaci na aromatickém jádře tyrosinamidu. Tím se z polymeru stal

stabilní radionosič vhodný pro intratumorální injekční aplikaci. Po intratumorálním podání ve zvířecím nádorovém modelu linie PC3 se ^{131}I–PNIPAM vysráží a vytvoří depotní strukturu. Ta minimalizuje difuzi radionuklidu mimo nádorovou masu a umožňuje cílené ozařování nádorových buněk v ložisku. Testováním *in vivo* bylo zjištěno, že při dávce 25 MBq došlo k regresi či úplné remisi tumoru; při 2 MBq byl pozorován pouze zpomalený růst[1]. Nepřítomnost lokálních zánětlivých a toxických reakcí a postupné vylučování polymeru naznačuje, že polymerní nosič je biokompatibilní a bioerodovatelný, přičemž radiojod zůstává pevně kovalentně vázán na polymer.

Závěrem lze říci, že ^{131}I-PNIPAM představuje slibný radionosič citlivý na vnější podněty (změnu teploty), který díky kombinaci termoresponzivity a radioaktivního izotopu nabízí jedinečnou možnost injekční a snadno dávkovatelné brachyterapie bez nutnosti chirurgické implantace a následného vyjmutí pevných zářičů.

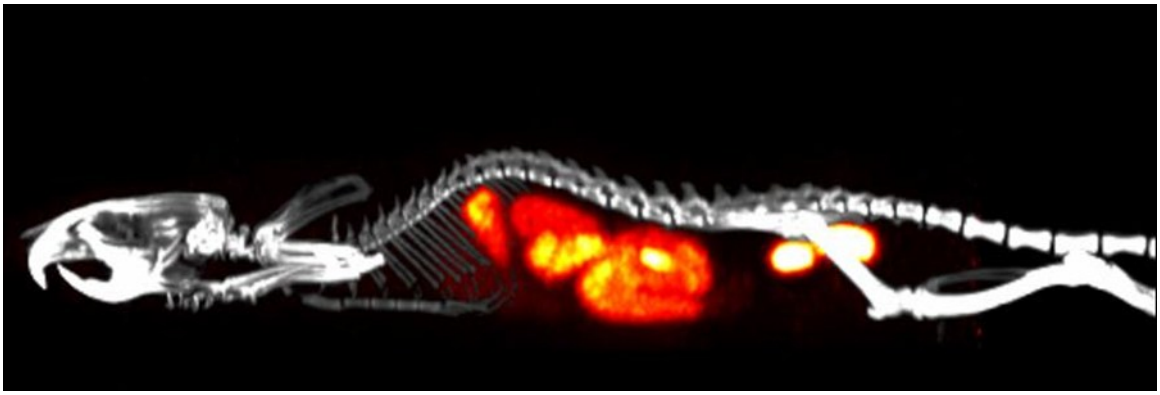
3. Rozvoj spolupráce

Rok 2012 znamenal posílení spolupráce nástupem MUDr. Jany Humajové (rozené Mattové) do doktorského studia na 1. LF UK. Její práce rozšířila výzkum směrem k farmakologickým aplikacím. Nejvýznamnějším výsledkem této etapy byl vývoj léčiva pro Wilsonovu chorobu a následně pro hemochromatózu[9–13]. Obě nemoci jsou způsobeny poruchou metabolismu, při níž se v organismu hromadí ionty mědi (Cu^{2+}, u Wilsonovy choroby)[9–11,13], respektive ionty železa (Fe^{2+}/Fe^{3+}, u hemochromatózy)[12]. Jejich vysoké koncentrace vedou k oxidačnímu stresu, nevratnému poškození orgánů a mohou mít i fatální následky.

Navržená polymerní chelatační léčiva představují posun od tradičních nízkomolekulárních ligandů (D-penicilamin, deferoxamin), které jsou zatíženy nízkou selektivitou, krátkým biologickým poločasem a významnými vedlejšími účinky. Vytvořené makromolekulární systémy využívají kovalentně zabudované specifické chelátory – zejména katecholové (1,2-dihydroxybenzen), pyrogallolové (1,2,3-trihydroxybenzen), 8-hydroxychinolinové a 1,10-fenantrolinové motivy. Tyto funkční skupiny poskytují multivalentní koordinační prostředí pro Cu^{2+} a Fe^{3+} a umožňují vznik stabilních komplexů. Polymerní nosiče byly konstruovány jako makroporézní síťované systémy nebo polysacharidové deriváty s vysokou hydrofilitou, což zajišťuje jejich retenci v gastrointestinálním traktu a omezuje systémovou absorpci. Tím se výrazně snižuje riziko toxicity – polymery fungují jako lokální sorbenty kovových iontů, které blokují jejich vstřebávání z potravy[9-13]. *In vivo* experimenty jako ^{64}Cu PET/CT (PET – pozitronová emisní tomografie, angl. Positron Emisson Tomography) potvrdily (viz obr. 1), že tyto systémy účinně snižují biologickou dostupnost železa a mědi, a to bez indukce cytotoxicity či prooxidačních účinků[9–13]. Nevstřebatelnost polymerů byla ověřena jejich radiojodací ^{125}I a následným sledováním pomocí SPECT/CT (SPECT – jednofotonová emisní výpočetní tomografie, angl. Single Photon Emisson Computed Tomography) *in vivo*. Navržené polymery jsou chráněny několika patenty na polysacharidové systémy se specifickými chelátory mědi a železa a představují perspektivní přístup k léčbě metabolických poruch kovů[11]. Tato etapa přinesla kromě patentů také nové publikace a grantové projekty, které dále upevnily vzájemnou spolupráci. Tento výzkum také ukázal potenciál polymerní chemie překonat limity nízkomolekulárních terapeutik.

4. Éra Centra pokročilého preklinického zobrazování (2015 – současnost)

V roce 2015 bylo na 1. LF UK založeno Centrum pokročilého preklinického zobrazování (CAPI) pod vedením RNDr. Luďka Šefce, CSc., s významným přispěním Ing. Pavly Francové. Špičkové přístrojové vybavení (PET, SPECT, MRI – magnetická rezonance, angl. Magnetic



Obr. 1. **PET/CT laboratorního potkana s radioizotopem ^{64}Cu aplikovaným žaludeční sondou.** Měď je patrná v celém zažívacím traktu a játrech. Její biologická dostupnost není limitována přítomností chelatujícího polymeru – přirozená biodistribuce u kontroly bez podání polymeru

Resonance Imaging, CT a další optické a ultrazvukové zobrazovací metody) umožnilo tomuto centru *in vivo* zobrazování biologických procesů, což výrazně posílilo společné projekty a umožnilo posun od základního výzkumu k preklinickým aplikacím. Spolupráce tak nabyla plně interdisciplinárního charakteru.

Společný výzkum se rozvíjel v několika směrech. Jedním z nich byl vývoj pokročilých termoresponzivních polymerů značených β-zářičem ^{90}Y, jejichž polymerní matrice byla funkcionalizována imunostimulačním polysacharidem β-glukanem a pro sledování biologického osudu doplněna fluorescenčním barvivem Dyomics 615 (cit.[14]). Tyto systémy spojují lokální depozici radionuklidu s aktivací imunitního systému, čímž dosahují synergického protinádorového efektu. Z chemického hlediska jde o funkcionalizované β-glukan-*graft*-poly(2-isopropyl-2-oxazolin-*co*-2-butyl-2-oxazolin)y s LCST přechodem mezi laboratorní a tělesnou teplotou, které po intratumorální aplikaci vytvářejí dočasně stabilní depot s navázaným ^{90}Y. Tím se dosahuje dlouhodobého ozáření nádorového ložiska včetně potlačení regulačních T_{reg} buněk chránících nádor před imunitní odpovědí při minimálním úniku radionuklidu do systémové cirkulace. Po vymření radionuklidu nastupuje imunomodulační efekt β-glukanu, který synergicky s radiací indukuje imunitní odezvu proti odumřelým zbytkům nádorové tkáně a tím i proti metastázám jinde v těle.

Další linií výzkumu byly polymerní nanočásticové a polymersomové nosiče chemoterapeutik, zejména doxorubicinu. Polymersom je nano- až mikrometrická vezikula vzniklá samouspořádáním amfifilních blokových kopolymerů ve vodě. Má dvojvrstvou polymerní membránu (jde o analogii liposomu), která je obvykle silnější a stabilnější než u liposomu, a umožňuje enkapsulovat hydrofilní látky do jádra a hydrofobní do membrány. Byly vyvinuty polymersomy citlivé na vnější podněty na bázi blokových kopolymerů, které reagují na změny pH, přítomnost vysokých hladin reaktivních forem kyslíku (ROS) v nádorovém mikroprostředí nebo kombinaci obou podnětů („AND gate“ multiresponzivní systémy[15–17]). V kyselém, nádorově specifickém mikroprostředí a/nebo pomocí ROS dochází k disociaci vezikul a zrychlenému uvolnění léčiva, zatímco ve fyziologických podmínkách (pH 7,4) zůstávají vezikuly stabilní. Tento přístup vede k vyšší akumulaci léčiva v nádoru, ke snížení jeho kardiotoxicity a prodloužené přežití experimentálních zvířat ve srovnání s volným doxorubicinem[18].

Významným směrem byl také výzkum polymerních radiosenzitizérů, konkrétně perfluoralkylovaných diselenidových nanočástic (tzv. fluorosomů)[19]. Tyto redoxně aktivní systémy katalyticky rozkládají H_2O_2 a oxidují intracelulární glutathion, čímž vyvolávají oxidativní stres a zvyšují citlivost nádorových buněk vůči ionizujícímu záření, zatímco zdravé buňky chrání. *In vivo* modely potvrdily, že kombinace diselenidových nanočástic s frakcionovanou radioterapií vede k úplnému potlačení růstu tumoru.

Současně probíhaly i práce na CT kontrastních gelech[8,20] a protetických materiálech (viz obr. 2), a také na studiu biologického osudu dceřiných radionuklidů alfa zářičů (^{225}Ac, ^{223}Ra) vázaných na nanočástice, což je zásadní pro bezpečné použití cílené terapie alfa zářiči[21,22]. Spolupráce zahrnuje i komplexní teranostické přístupy, například projekt zaměřený na vývoj léčiva cíleného na receptory FAP (angl. Fibroblast Activation Protein). Tento projekt spojuje diagnostickou zobrazovací složku s terapeutickým účinkem a je realizován ve spolupráci ÚMCH, Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB) a 1. LF UK.

5. Vybavení laboratoří

Radiochemická laboratoř ÚMCH má povolení k nakládání s radionuklidy ^{125}I, ^{131}I, ^{99m}Tc, ^{111}In a ^{90}Y. Je vybavena ionizačními komorami, scintilačními detektory NaI (Tl), HPLC systémy s radiodetektory (Berthold) a radioscannerem Typhoon 7000. Jak je specifikováno výše, pracoviště CAPI je vybaveno zobrazovacími systémy PET,

Obr. 2. **CT laboratorní myši s implantovaným gelem,** barevně je odlišena opacita implantátů

SPECT, MRI, CT a optickými modalitami. V blízké době má být rozšířeno o kombinované SPECT/MRI a spektrální CT. Zobrazovací systém Albira (výrobce Bruker) umožňuje například PET sledování nádorů pomocí [^{18}F]-fluorodeoxyglukosy (^{18}F-FDG) a SPECT zobrazování s využitím izotopů ^{125}I a ^{99m}Tc.

Toto rozdělení vybavení odpovídá koncepci: Příprava či radioznačení vzorků (včetně těch od spolupracujících skupin a ústavů) probíhá na ÚMCH, zatímco biologické testování na pracovištích 1. LF UK.

6. Praktické požadavky a etické aspekty preklinického výzkumu

Vzorky určené k *in vivo* aplikaci musí mít fyziologické pH a být izotonické. Jako pomocná rozpouštědla lze použít pouze malé množství ethanolu nebo dimethylsulfoxidu (maximálně do 10 %). U imunokompetentních zvířat nejsou vyžadovány absolutní sterilní podmínky, avšak biologická kontaminace vzorků je nepřípustná. Je možné implantovat polymerní implantáty přiměřené velikosti (válečky o průměru cca 5 mm v průměru; sterilní, fixované tkáňovým lepidlem) a jejich biologický osud (biodegradaci) sledovat pomocí CT, UZ (ultrazvukového zobrazování) nebo MRI.

Objemy aplikovaných léčiv a vzorků se liší podle druhu zvířete: u myší je to přibližně 100–150 µl intravenózně i subkutánně, stovky µl perorálně a jednotky až desítky µl intratumorálně či intramuskulárně. Používané modely zahrnují myši (kmeny C57BL/6, BALB/c, Nu/Nu, NOD), potkany (Wistar, Lewis) a jen výjimečně také králíky.

Každý experiment na obratlovcích vyžaduje schválený projekt pokusů na zvířatech (PP) v souladu se zákonem na ochranu proti týrání zvířat. Proces schvalování probíhá v gesci Ministerstva zemědělství České republiky a podle očekávané míry závažnosti pro laboratorní zvířata může trvat i několik měsíců. Welfare zvířat je zajištěno na vysoké úrovni; jde o podmínku získání nezkreslených výsledků bez zbytečného stresu pokusných zvířat i společenský požadavek a morální závazek.

7. Ekonomické a provozní aspekty

Preklinický výzkum je finančně náročný. Běžné laboratorní myši (např. kmenů C57BL/6 nebo BALB/c) stojí kolem 1 500 Kč; potkani (Wistar, Lewis) jsou o něco levnější, práce s nimi je však náročnější a existuje pro ně méně dostupných modelů onemocnění. Imunokompromitované kmeny (Nu/Nu, NOD) a geneticky modifikované myši stojí v řádu tisíců až desetitisíců korun a do nákladů je nutné zahrnout i ustájení zvířat. Hodina strojového času (PET/SPECT/CT, MRI) stojí řádově tisíce korun; u grantových projektů a při společných publikacích se náklady obvykle dělí mezi partnery.

8. Závěr a perspektivy

Spolupráce Radiochemické laboratoře ÚMCH a 1. LF UK se během patnácti let rozvinula od prvotního biologického testování radioaktivních polymerů na Ústavu biofyziky až k plně interdisciplinárním projektům v rámci CAPI. Výsledkem jsou desítky společných publikací a pět patentů a užitných vzorů s přímým přesahem do medicíny[16]. Do budoucna se předpokládá rozšíření spektra používaných radionuklidů i zavedení nových zobrazovacích modalit[17]. Spolupráce představuje modelový příklad propojení chemie, biologie a medicíny v ČR a zůstává výjimečný i celosvětově[18].

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (grant LUAUS24272, LUAUS24203 a projekt EATRIS-CZ, LM2023053), Ministerstvem zdravotnictví ČR (AZV, grant NW24-03-00387) a projektem Strategie AV21 (výzkumný program „Průlomové technologie budoucnosti – senzorika, digitalizace, umělá inteligence a kvantové technologie“, výzkumné téma „Nové korelativní techniky pro analýzu a zobrazování biologických a syntetických polymerních materiálů“).

LITERATURA

1. Hruby M., Pouckova P., Zadinova M., Kucka J., Lebeda O.: Eur. J. Pharm. Sci. *42*, 484 (2011).
2. Kostiv U., Lobaz V., Kučka J., Švec P., Sedláček O., Hrubý M., Janoušková O., Francová P., Kolářová V., Šefc L., Horák D.: Nanoscale *9*, 16680 (2017).
3. Sedlacek O., Kucka J., Mattova J., Parizek M., Studenovsky M., Mackova H., Lobaz V., Pouckova P., Hruby M.: Eur. J. Pharm. Sci. *63*, 216 (2014).
4. Patsula V., Horák D., Kučka J., Macková M., Lobaz V., Francová F., Herynek V., Heizer T., Páral P., Šefc L.: Sci. Rep. *9*, 10765 (2019).
5. Kostiv U. a 11 spoluautorů: Sci. Rep. *10*, 20016 (2020).
6. Macková H., Plichta Z., Proks V., Kotelnikov I., Kučka J., Hlídková H., Horák D., Kubinová Š., Jiráková K.: Macromol. Biosci. *16*, 1621 (2016).
7. Oleshchuk D., Sálek P., Dvořáková J., Kučka J., Pavlová E., Francová P., Šefc L., Proks V.: Mater. Sci. Eng. C *126*, 111865 (2021).
8. Kolouchová K., Herynek V., Groborz O., Páral P., Kučka J., Šefc L., Hrubý M.: Chem. Mater. *36*, 4417 (2024).
9. Škodová M., Kučka J., Mattová J., Poučková P., Hrubý M.: React. Funct. Polym. *73*, 1426 (2013).
10. Mattová J., Poučková P., Kučka J., Škodová M., Vetrík M., Štěpánek P., Urbánek P., Petřík M., Nový Z., Hrubý M.: Eur. J. Pharm. Sci. *62*, 1 (2014).
11. Vetrík M. a 11 spoluautorů: J. Controlled Release *273*, 131 (2018).
12. Groborz O. a 19 spoluautorů: Macromol. Biosci. *20*, 2000254 (2020).
13. Vetrík M. a 11 spoluautorů: J. Controlled Release

259, E97 (2017).
14. Loukotová L., Pár al P., Kolářová V., Heizer T., Šefc L., Štěpánek P., Hrubý M.: J. Controlled Release *268*, 78 (2017).
15. Jäger A., Sedláček O., Kučka J., Hrubý M.: Biomacromolecules *19*, 2443 (2018).
16. Jäger E., Kučka J., Šefc L., Hrubý M.: Biomacromolecules *21*, 1437 (2020).
17. Jäger E. a 12 spoluautorů: Adv. Healthcare Mater. *10*, 2100304 (2021).
18. Albuquerque L. J. C., Kučka J., Šefc L., Hrubý M: J. Controlled Release *332*, 529 (2021).
19. Vetrík M. a 11 spoluautorů: Free Radical Biol. Med. *187*, 132 (2022).
20. Groborz O. a 24 spoluautorů: Adv. Healthcare Mater. *11*, 2201344 (2022).
21. Sakmár M., Kozempel J., Kučka J., Janská T., Stíbr M., Vlk M., Šefc L.: Nucl. Med. Biol. *130*, 108890 (2024).
22. Sakmár M., Kozempel J., Kučka J., Janská T., Stíbr M., Vlk M., Šefc L.: Nucl. Med. Biol. *140*, 108973 (2025).

J. Kučka[a], J. Humajová[c], M. Vetrík[a], J. Pánek[a], M. Hrubý[a], M. Zadinová[c], P. Francová[b], L. Šefc[b], and P. Poučková[c] *([a] Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, [b] Center for Advanced Preclinical Imaging, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, [c] Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic):* **Fifteen Years of Cooperation between the Radiochemical Laboratory of the Institute of Macromolecular Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic and the First Faculty of Medicine of the Charles University**

The Radiochemical Laboratory of the Institute of Macromolecular Chemistry, Czech Academy of Sciences (CAS), was established in 2009 to advance the synthesis and characterization of radiolabeled polymers and nanoparticles. From the outset, close collaboration with the biological and medical departments of the First Faculty of Medicine, Charles University, proved essential. This article summarizes a fifteen-year collaboration, from the earliest experiments at the Institute of Biophysics and Informatics to the current era of the Center for Advanced Preclinical Imaging (CAPI). The partnership has led to joint publications, projects, and patents with implications for medicine. The text further provides an overview of technical equipment, practical requirements for *in vivo* experiments, and the economic aspects of preclinical research.

Keywords: radiopharmaceuticals, radioactively labeled compounds, biodistribution, biological testing, imaging methods

Acknowledgements
This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grants LUAUS24272, LUAUS24203, and the EATRIS-CZ project, LM2023053), the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV, grant NW24-03-00387), and the Strategy AV21 project (research program "Breakthrough Technologies for the Future – Sensing, Digitization, Artificial Intelligence and Quantum Technologies," research topic "New correlative techniques for the analysis and imaging of biological and synthetic polymer materials").

Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.