Citlivější detekce biomolekul?

Klíčem je propojení nanokartáčů a optických vláken

Jana Žďárská

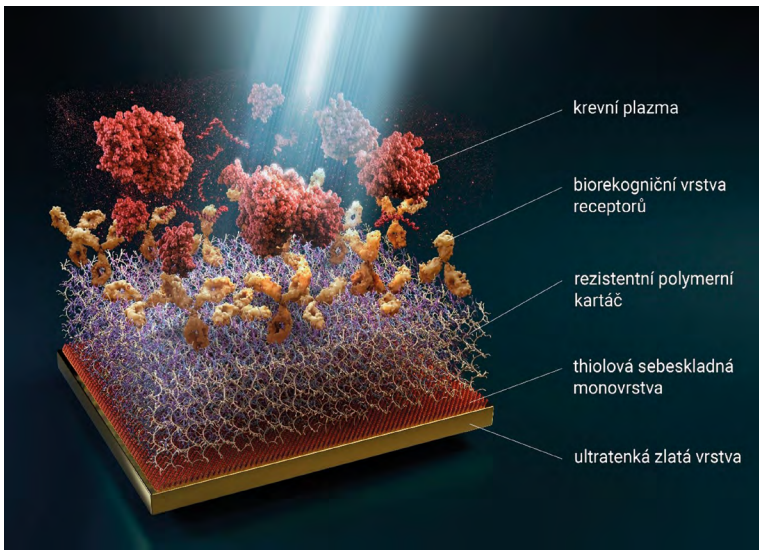
Fyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8; zdarskaj@fzu.cz

Vědkyně a vědci pod vedením Hany Lísalové ze Sekce optiky Fyzikálního ústavu AV ČR dosáhli významného vědeckého průlomu v oblasti optických vláknových senzorů. Poprvé se jim podařilo zkombinovat dvě pokročilé technologie – antifoulingové polymerní kartáče a senzory na bázi optických vláken, jejichž spolehlivost tím výrazně zvýšili. Tento inovativní přístup otevírá cestu k přesné detekci biomolekul i v tak náročném prostředí, jakým je například krevní plazma.

Nově zřízená Laboratoř funkčních biorozhraní se zaměřuje na prohlubování současných znalostí mezifázových biomolekulárních interakcí v jejich přirozeném prostředí a na vývoj nových funkčních biomateriálů pro různé medicínské aplikace. Výzkum se zabývá aktuálními tématy v oblasti biofyziky, biologie, molekulární biologie, chemického inženýrství a bioinženýrství. Zde probíhající vědecké přístupy zahrnují použití širokého spektra technik pro charakterizaci funkčních povrchů, kombinovaných s bioanalytickými, chemickými a biochemickými metodami. Tato vysoce interdisciplinární infrastruktura a znalosti umožňují vytvářet široké platformy pro řešení důležitých výzkumných úkolů. Zdejší výzkum zahrnuje také vývoj nových metodik pro zkoumání interakcí na biorozhraních, jako jsou nové přístupy k architektuře funkčních povlaků nebo studium dynamiky biomolekulárních interakcí na povrchu.

Zmiňovaná nová metoda detekce biomolekul byla vyvinuta ve spolupráci týmu Fyzikálního ústavu AV ČR a italského Institutu aplikované fyziky Nello Carrara v rámci mezinárodního konsorcia NABABAS a využívá speciální antifoulingový[1] terpolymerní kartáč (ATB) – polymerní povlak se speciálními vlastnostmi, který minimalizuje nežádoucí adsorpci biomolekul a umožňuje selektivní navázání cílových analytů.

Vědci tento koncept představili na modelové detekci protilátek a prokázali tím vysokou citlivost i odolnost nově upravených senzorů. Výsledky byly publikovány v časopise Biomaterials Science, kde se práce dostala



Obr. 1 Grafické znázornění antifoulingového terpolymerního kartáče, který minimalizuje nespecifickou adsorpci biomolekul z komplexního roztoku (např. krevní plazmy) a umožňuje selektivní navázání cílových analytů.

i na obálku čísla. *„V našem týmu jsme vyvinuli metodu, která umožňuje optickým vláknovým senzorům pracovat s vysokou přesností i v náročných biologických prostředích, jako je krevní plazma. Klíčem k úspěchu byla nejen pokročilá technologie nanokartáčů (nanokartáč je polymerní vrstva, tvořená hustě propletenými řetězci makromolekul/polymerů, které svojí strukturou připomínají štětiny kartáče; tloušťka této vrstvy je v řádech nanometrů), ale také spolupráce v rámci týmu a s kolegy z Itálie. Společně se nám podařilo překonat dlouhodobou překážku v oblasti biosenzoriky, založenou na využití optických vláken – tj. rozvinout jejich využití při detekci biomolekul v komplexních prostředích a otevřít cestu k širšímu praktickému využití těchto citlivých senzorů,“* vysvětluje Hana Lísalová, vedoucí Laboratoře funkčních biorozhraní. *„Pro člověka – vědkyni – je*

1 Termín „antifoulingový“ označuje vlastnost, která brání usazování biologických nečistot (tzv. foulingu) na povrchu materiálů. Tato technologie se používá ve vodném prostředí, např. v lodním průmyslu, ale také v lékařství a nanotechnologiích. V biosenzorech se antifoulingové vlastnosti využívají hlavně k tomu, aby se na povrchu senzoru neusazovaly nežádoucí molekuly a nesnižovaly tak jeho funkčnost a citlivost.

Ing. Markéta Vrabcová působí od roku 2018 jako specialistka na polymerní povlaky v Laboratoři funkčních biorozhraní Fyzikálního ústavu AV ČR. Zabývá se přípravou polymerních kartáčů, studiem jejich fyzikálně-chemických vlastností a vlivem na biorekognici a antifoulingové chování. Vystudovala obor Analýza léčiv na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a od roku 2021 pokračuje v doktorském studiu biofyziky, chemické a makromolekulární fyziky na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy, kde se zaměřuje na vývoj pokročilých polymerních materiálů pro bioanalytické a biomedicínské aplikace. Je spoluautorkou 16 vědeckých publikací, z toho čtyř jako hlavní autorka, a podílí se na dvou patentech. Aktivně spolupracuje s mezinárodními výzkumnými institucemi a výsledky své práce prezentovala na prestižních konferencích (např. European Biosensor Symposium 2021, Frontiers in Polymer Science 2023, Future Materials 2024, Biosensors Congress 2025).

RNDr. Hana Lísalová, Ph.D., vystudovala biofyziku na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, kde také získala doktorát. Svou odbornou dráhu rozšířila během postdoktorandského pobytu na University of Washington v Seattlu v oboru chemického inženýrství. Od roku 2017 působí ve Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky, kde v roce 2019 založila a vede Laboratoř funkčních biorozhraní. Vede studenty doktorského studia na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy, kde zároveň i vyučuje, a je členkou oborové rady doktorského studia programu Biofyzika, chemická a makromolekulární fyzika.

Odborně se zaměřuje na výzkum biosenzorů, bioinspirovaných materiálů a funkčních nanovrstev, zejména na studium biomolekulárních interakcí v podmínkách blízkých přirozenému prostředí. Její tým vyvíjí antifoulingové povrchy a pokročilé biosenzorické platformy s využitím metod SPR a QCM, které nacházejí uplatnění v medicíně, potravinářství a bezpečnostních technologiích.

Je autorkou více než 55 vědeckých publikací, tří kapitol v odborných knihách a šesti patentů. Její práce byla citována více než 2900krát (Web of Science). Za své výsledky získala řadu ocenění, mj. Cenu Wernera von Siemense (2022), ICBZM Mid-career Award na Cornell University (2024) a Biomaterials Science Emerging Investigator Award (2025).

Vedle vědecké činnosti se věnuje také popularizaci vědy a aktivitám podporujícím ženy v akademické sféře. S manželem žijí na okraji Prahy a vychovávají tři dcery – Helenu, Adélu a Justýnu.

velmi motivující vidět, že se podaří propojit dvě rozdílné technologie. V propojování dosud nepropojeného vidím obrovský potenciál. Velké díky patří doktorandkám z našeho týmu, zejména Markétě Vrabcové, za její houževnatost a vytrvalost dotáhnout takto komplexní mezioborovou práci do zdárného konce.“

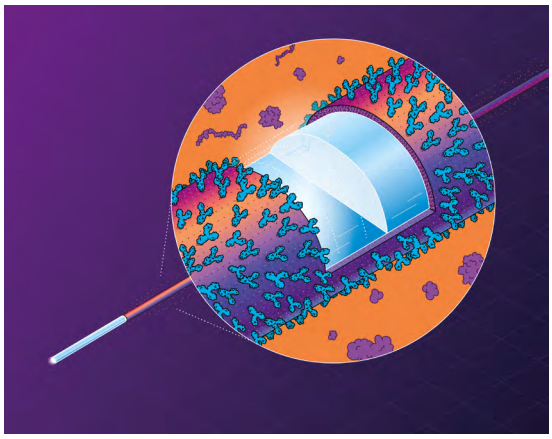
Týmová spolupráce je pro vědce velmi důležitá – dobře se tímto způsobem kombinují zkušenosti i nadšení jednotlivých členů týmu. Velký přínos má taková spolupráce především pro začínající vědce. *„Tato spolupráce mi umožnila velký kariérní růst a přinesla mi cenné zkušenosti pro práci ve vědeckém prostředí,“* doplňuje Markéta Vrabcová, doktorandka, která se na zmiňovaném výzkumu významně podílela.

Optické vláknové senzory patří mezi špičkové technologie pro bioanalytické aplikace. Jejich využití v reálných biologických podmínkách bylo dosud velmi limitované z důvodu chybějících efektivních postmodifikačních strategií, které by umožnily na jedné straně vysokou schopnost rozpoznávání vybraných biomolekul a na straně druhé by zabraňovaly přichytávání nežádoucích biomolekul. Právě tuto překážku se podařilo překonat pomocí polymerního nanokartáče – principu, s nímž má tým Laboratoře funkčních biorozhraní bohaté zkušenosti a dosáhl řady mezinárodních úspěchů. Tento kartáč se jim podařilo syntetizovat přímo na citlivé oblasti optického vlákna s dlouhoperiodickou mřížkou, kterou tak chrání před (bio)foulingem.

Nově vyvinutý ATB je složen z karboxybetainmethakrylamidu, sulfobetainmethakrylamidu a *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu. Jeho vynikající antifoulingové vlastnosti pramení z kombinace několika faktorů: *„Prvním z nich je vysoká hydrofilita, to znamená, že povrch kartáče silně interaguje s vodou, čímž vytváří ochrannou vrstvu, která brání přichycení nežádoucích biomolekul,“* podotýká Hana Lísalová. *„Druhou vlastností je tzv. elektroneutralita, tedy skutečnost, že se pozitivní a negativní náboje v polymerní struktuře vzájemně vyrovnávají, což minimalizuje elektrostatickou přitažlivost nechtěných biomolekul. Dalšími faktory jsou biokompatibilita a možnost funkcionalizace – polymerní kartáč lze snadno přizpůsobit pro selektivní detekci konkrétních biomolekul.“*

Funkčnost terpolymerního kartáče na povrchu optických vláknových senzorů byla ověřena pokročilými metodami, jako jsou například skenovací elektronová mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a bezznačkové optické biodetekční experimenty, a její účinnost byla potvrzena v krevní plazmě. Testy ukázaly, že senzory s tímto povlakem výrazně snižují nespecifickou adsorpci biomolekul i při dlouhodobém kontaktu s krevní plazmou. Zároveň umožňují funkční vazbu protilátek a detekci cílových biomolekul v reálném čase s vysokou selektivitou.

A co tento skvělý výzkumný výsledek znamená pro lidstvo? Rozhodně nové možnosti v medicíně a biotechnologiích. Díky kombinaci antifoulingových a biorekogničních (termín „biorekogniční“ označuje schopnost povrchu nebo materiálu specificky rozpoznávat



Obr. 2 Optický vláknový senzor s dlouhou periodou mřížky (LPG) modifikovaný antifoulingovým terpolymerním kartáčem, který je přímo syntetizovaný na citlivém povrchu vlákna. Povlak zajišťuje vynikající odolnost vůči nespecifické adsorpci biomolekul v komplexních biologických vzorcích (např. krevní plazmě) a zároveň umožňuje navázání biorekogničních prvků. Kombinace antifoulingových polymerních kartáčů a optických vláknových senzorů poskytuje vysokou citlivost a selektivitu při detekci biomolekul v reálném čase, a má tudíž velký potenciál pro pokročilé bioanalytické a diagnostické aplikace. (Obrázek vyšel jako grafika na zadní obálku časopisu Biomaterials Science, ve kterém byly publikovány výsledky této studie.)

Obr. 3 Přenosný biosenzor, vyvinutý vědeckým týmem Hany Lísalové na zakázku pro bezpečnostní složky Policie ČR. Zařízení založené na principu křemenných mikrovah (QCM) umožňuje rychlou a spolehlivou detekci patogenů v potravinách. Kompaktní konstrukce je vhodná pro nasazení v terénu a zajišťuje vysokou citlivost měření díky využití antifoulingových polymerních kartáčů na povrchu senzorů.

biologické molekuly – např. bílkoviny, protilátky či DNA) vlastností představují ATB nanokartáče zásadní inovaci v oblasti biosenzoriky. Mohou se uplatnit například při rychlé diagnostice infekčních onemocnění, sledování biomarkerů v krvi nebo v potravinové bezpečnosti. Tato metoda otevírá cestu k vývoji vysoce citlivých biosenzorů, které lze použít v terénu i v klinické praxi, čímž se výrazně rozšiřují možnosti moderní diagnostiky a analytické chemie. *„Optické vláknové senzory mají obrovský potenciál v oblasti diagnostiky a environmentální analýzy. Vývoj efektivních antifoulingových povlaků, jako je právě ATB, znamená důležitý krok k jejich širšímu využití v praxi. Investice do pokročilých technologií v této oblasti nejenže posouvají hranice současné vědy, ale také reagují na zásadní společenské výzvy, jako je dostupná a přesná diagnostika či zajištění bezpečnosti potravin a vody,“* říká Alexandr Dejneka, vedoucí Sekce optiky Fyzikálního ústavu.

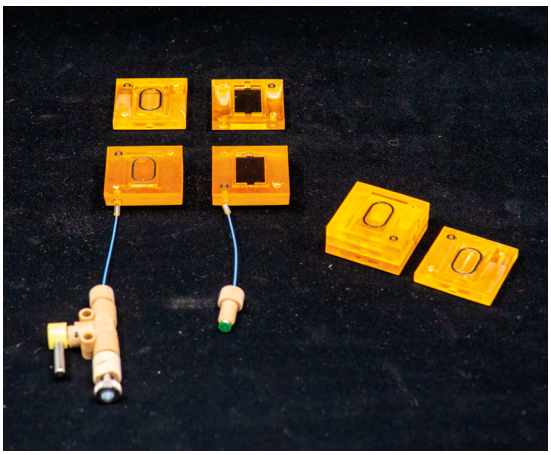
Současnou důležitou otázkou nyní je, jak zrychlit a zjednodušit přípravu polymerních kartáčů, které jsou základem těchto moderních biosenzorů. Tým Hany Lísalové již řešení nalezl – navrhl a vyrobil mikrofluidní[2] reaktor pomocí 3D tisku. Tento nový způsob přípravy tenkých polymerních vrstev tak umožňuje lépe kontrolovat jejich vlastnosti a zároveň šetří čas i chemikálie. Výsledky uvedeného výzkumu byly publikovány v prestižním časopise Chemical Engineering Journal.

Polymerní kartáče, ultratenké vrstvy polymerů navázané na povrch materiálů, hrají klíčovou roli v biosenzorech, diagnostických čipech i dalších bioanalytických technologiích. Jako ultratenké jsou označovány materiály nebo vrstvy s extrémně malou tloušťkou, obvykle v nanometrovém měřítku (řádově 10^{-9} metru). Dosavadní metody jejich výroby v klasických reaktorech byly však málo efektivní. Proto byl využit 3D tisk k vytvoření mikrofluidního skládaného reaktoru, díky němuž je možné polymerovat desítky substrátů najednou s minimální spotřebou chemikálií.

Detailní charakterizace pomocí infračervené spektroskopie (IRRAS), spektroskopické elipsometrie, rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS) a povrchové plazmonové rezonance (SPR) ukázala, že kartáče připravené v mikrofluidním reaktoru mají srovnatelné, a v některých ohledech dokonce i lepší vlastnosti než kartáče vytvořené klasickými metodami. V mikrofluidním reaktoru rostou kartáče rychleji, dosahují vyšší hustoty a dají se snadněji ladit i jejich požadované vlastnosti. Nový přístup navíc otevírá cestu k přípravě složitějších vícevrstvých struktur a k výrobě povrchů s různými funkcemi na jednom čipu. *„Velké uznání patří Scottu Lynnovi, který mikrofluidní skládaný reaktor navrhl a vytiskl, a Markétě Vrabcové, která vedla přípravu a testování polymerních vrstev. Markéta je jedním z pilířů našeho týmu v oblasti syntetických metod – v tomto projektu skvěle uplatnila své dlouholeté zkušenosti nasbírané ve Fyzikálním ústavu. Její spolupráce se Scottem se ukázala jako mimořádně funkční spojení,“* doplňuje Hana Lísalová. *„Na začátku výzkumu nám několik lidí tvrdilo, že tímto způsobem polymerní kartáče vyrobit nepůjdou,“* objasňuje N. Scott Lynn, který tento projekt vedl, a upřesňuje: *„To nás donutilo být ještě důkladnější a měli jsme velkou radost, že mikroreaktory se nejen mnohem snadněji používají, ale také vytvářejí vrstvy tak vysoké kvality. 3D tisk nám pak pomohl přizpůsobit zařízení, aby dokázalo splnit náročné požadavky, které tento typ chemie vyžaduje.“*

Jak by mohl vypadat výhled 3D tisku v materiálovém inženýrství do budoucna? Význam výzkumu pře-

2 Termín „mikrofluidní“ se používá pro manipulaci s velmi malými objemy kapalin (typicky mikrolitry až nanolitry) v mikroskopických kanálcích, často používaných v laboratořích na čipu (tzv. lab-on-chip) i biosenzorech.



Obr. 4 Fotografie mikrofluidního skládaného reaktoru, vyvinutého pro škálovatelnou syntézu polymerních kartáčů. Reaktor umožňuje efektivní syntézu metodou SI-ATRP, což vede k tvorbě silnějších a hustěji uspořádaných polymerních nanovrstev. Mikrofluidní přístup dále umožňuje přípravu pokročilých struktur, jako jsou blokové kopolymery, a nabízí vyšší kontrolu a reprodukovatelnost ve srovnání s tradičními metodami. Tyto mikrofluidní skládané reaktory byly využity v rámci studie publikované v prestižním Chemical Engineering Journal.

sahuje oblast biosenzoriky a ukazuje nové možnosti pro využití 3D tisku v řízení chemických procesů. *„Ve Fyzikálním ústavu máme dlouhodobou expertizu v oblasti 3D tisku pro vědecké i technologické aplikace. Tento výzkum krásně ilustruje, jak můžeme využít aditivní technologie k návrhu chytrých reaktorů a zařízení pro materiálové inženýrství, biofotoniku i medicínu,“* doplňuje Alexandr Dejneka.

Tým Laboratoře funkčních biorozhraní nyní připravuje polymerní vrstvy se složitějšími vzory. Tyto techniky umožňují nanášet různé složení polymerů na jediný povrch, což vědcům pomáhá zkoumat, jak molekulární struktura ovlivňuje vlastnosti materiálu. Kromě toho se týmu podařilo zvládnout polymeraci i v mikrolitrových objemech – což je v chemii mimořádně náročné, protože při tak malém měřítku se výrazně mění podmínky reakce. Škálování syntézy totiž naráží na specifické limitace. Odlišná kinetika v mikrofluidních reaktorech může vést k nehomogennímu růstu kartáčů, vysoký poměr povrchu k objemu ztěžuje udržení inertní atmosféry nezbytné pro úspěšnou polymeraci a i drobné nepřesnosti v přípravě směsi monomerů a katalyzátorů mohou významně ovlivnit výslednou strukturu. Zajištění reprodukovatelnosti v takto malých objemech proto vyžaduje pečlivou optimalizaci podmínek a přesné technické provedení.

V současné době se výzkumníci pouštějí do další výzvy, a to do syntézy polymerních vrstev v ještě menším měřítku – v nanolitrech, a dokonce i femtolitrech, tedy miliardkrát menších než mikrolitr. Na této práci tým úzce spolupracuje s Dioscuri Centrem jednomolekulární optiky, které vede Barbora Špačková.

Je zjevné, že v nanosvětě tenkých biofunkčních polymerních vrstev na bázi antifoulingových polymerních kartáčů je stále co objevovat a kam se posouvat. Od základních objevů vede přitom velmi dlouhá cesta k budoucímu praktickému využití. Přitom základní výzkum a praktická ověřování jsou často oddělené světy vyžadující různé přístupy. *„My se v našem týmu snažíme oba světy propojovat, klást si i praktické otázky v rámci našeho výzkumu. V současné době jsme zahájili komercializační aktivity patentované technologie terpolymerních kartáčů pod obchodní značkou FUNBRUSH™ a věříme, že se nám podaří prolomit současné bariéry v oblastech, jako je veřejné zdraví, bezpečnost či kvalita potravin,“* připomíná Hana Lísalová.

Je velmi potěšující vnímat, jak úžasný výzkum probíhá na českých vědeckých institucích a jak vysoce je oceňován v zahraničí. Je tak dobře vidět, že věda je jen jedna – světová – a čeští vědci jsou velmi platní a užiteční v jejích mezinárodních řadách.

Obr. 5 Detail vnitřního uspořádání přenosného QCM detekčního zařízení. Senzory s povrchem modifikovaným antifoulingovými polymerními kartáči umožňují selektivní vazbu cílových biomolekul a minimalizují nespecifickou adsorpci z komplexního vzorku. Systém je optimalizovaný pro rychlou analýzu vzorků v oblasti bezpečnosti potravin a ochrany zdraví.