

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Soňa Kikerlová

Značení buněk pro MRI pomocí neběžných magnetických nanočástic

Cellular labelling using non-usual magnetic nanoparticles

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

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, 18. 8. 2011

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D. a Doc. RNDr. Janu Černému, Ph.D. za projevenou ochotu ke vzájemné spolupráci, trpělivost a cenné připomínky při psaní této bakalářské práce.

Abstrakt

Mezi běžně používané zobrazovací techniky v klinické praxi patří MRI (zobrazování magnetickou rezonancí). Jedná se o metodu pro pacienta zcela neinvazivní, která umožňuje trojrozměrné zobrazování těla na základě detekce vodíkových atomů molekul vody obsažených v jednotlivých tkáních. Intenzita signálu může být navíc ovlivněna přidáním vhodné kontrastní látky.

Před vlastním použitím nově připravených kontrastních agens je nutné provést základní *in vitro* a *in vivo* experimenty na buněčných liniích a zvířecích modelech, aby případné nežádoucí účinky těchto nanosond na živé organizmy byly odhaleny ještě dřív, než dojde k jejich zavedení do klinické praxe.

Současný rozmach nanotechnologií nabízí širokou škálu nanomateriálů, včetně magnetických nanočástic, určených převážně pro snížení intenzity MRI signálu. Mezi nejběžnější a nejdéle používaná kontrastní agens pro MRI patří superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO). V této literární rešerši jsou představeny méně běžné typy magnetických nanočástic, které je také možné použít pro zobrazování magnetickou rezonancí.

Klíčová slova: magnetická rezonance, nanočástice, značení buněk

Abstract

MRI (magnetic resonance imaging) belongs to an imaging technique in a clinical practice. It is the method completely non-invasive for a patient, which allows three-dimensional imaging of the body based on the detection of hydrogen atoms of water molecules in individual tissues. Intensity of signal can be further influenced by adding a suitable contrast agent.

It is necessary to perform basic *in vitro* and *in vivo* experiments on a cell cultures and animal models before a new contrast agents will be introduced into the clinical practice. This is due to potential side effects on living organisms.

The current boom in nanotechnology offers a variety of nanomaterials including magnetic nanoparticles for decreasing the intensity of the MRI signal. The most common and longest used contrast agents for MRI are based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO). In this literature review will be presented uncommon types of magnetic nanoparticles which can also be used for the magnetic resonance imaging.

Key words: magnetic resonance imaging, nanoparticle, cellular imaging

Obsah

Abstrakt	5
Abstract.....	6
Seznam použitých zkratek	9
1. Vezikulární transport (<i>Vesicular trafficking</i>)	11
1.1. Fagocytóza.....	12
1.2. Pinocytóza	13
1.2.1. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza (CME).....	13
1.2.2. Kaveoly zprostředkovaná endocytóza (CvME).....	14
1.2.3. Makropinocytóza.....	15
1.2.4. Endocytóza nezávislá na klatrinu a kaveolech	15
2. Metody značení buněk.....	16
2.1. Nespecifické značení buněk	16
2.1.1. Značení buněk pomocí radioizotopů	17
2.1.2. Značení buněk pomocí kontrastních látek pro MRI.....	17
2.1.3. Značení buněk pomocí kvantových teček	18
2.1.4. Transfekce	18
2.1.5. Elektroporace.....	19
2.1.6. Genové pistole (<i>Gene guns</i>)	20
2.2. Specifické značení buněk	20
2.3. Cytotoxicita	21
3. Studium buněk <i>in situ</i>	22
3.1. Optické metody	22
3.1.1. Obecné principy.....	22
3.1.2. Výhody a nevýhody optických metod	24
3.2. Průtoková cytometrie.....	24
3.3. MRI.....	25
4. MRI (zobrazování magnetickou rezonancí)	26
4.1. Historie MRI.....	26
4.2. Princip MRI.....	27
4.3. Kontrastní látky v MRI.....	29
4.4. MRI v klinické praxi	29
4.4.1. Výhody MRI.....	30

4.4.2. Nevýhody MRI.....	30
5. Neběžné magnetické nanočástice používané v MRI	30
5.1. Ferity se spinelovou strukturou MFe_2O_4 (M = Fe, Co, Mn, Ni, Zn)	31
5.1.1. $Fe^{2+}Fe_2^{3+}O_4$	31
5.1.2. $CoFe_2O_4$	32
5.1.3. $MnFe_2O_4$	33
5.1.4. $NiFe_2O_4$	33
5.1.5. $ZnFe_2O_4$	34
5.1.6. Zhodnocení relaxivity vybraných spinelových fází	34
5.2. Perovskitové manganity	35
5.4. Oxidy lanthanoidů Ln_2O_3 (Ln = Nd, Gd, Dy, Er, Yb)	35
5.4. Fluoridy lanthanoidů	36
6. Závěr.....	37
7. Seznam použité literatury	38

Seznam použitých zkratek

μ	magnetický moment
Arf6	ADP-ribozilační faktor 6 (<i>ADP-ribosylation factor 6</i>)
B_0	magnetické pole
C3, C4, C5	proteiny komplementu C3, C4 a C5
CA	kontrastní látka (<i>Contrast agents</i>)
Cdc42	protein kontroly buněčného dělení Cdc-42 (<i>Cell division control protein 42 homolog</i>)
CLIC	transport nezávislý na klatrinu (<i>Clathrin-independent carries</i>)
CME	klatrinem zprostředkovaná endocytóza (<i>Clathrin-mediated endocytosis</i>)
CR	receptor komplementu (<i>Complement receptor</i>)
CT	výpočetní nebo též počítačová tomografie (<i>Computed tomography</i>)
CTxB	cholera toxin B (<i>Cholera toxin B</i>)
CvME	kaveoly zprostředkovaná endocytóza (<i>Caveolae-mediated endocytosis</i>)
CVV	váček obalený klatrinem (<i>Clathrin Coated Vesicles</i>)
FACS	průtokový cytometr (<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>)
FcR	Fc receptor (<i>Fragment crystallizable receptor</i>)
Gd-DTPA	komplex gadolinia s diethylenetriaminpentaoctovou kyselinou
Gd-HP-DO3A	komplex gadolinia s komerčním názvem Gadoteridol
GEEC	GPI obohacené časně endosomy (<i>GPI-enriched early endosomal compartments</i>)
GFP	zelený fluorescenční protein (<i>Green fluorescent protein</i>)
GPI	glykofosfatidylinositol (<i>Glycophosphatidylinositol</i>)
GTPáza	GTP fosfohydroláza
Hsp70	protein teplotního šoku Hsp70 (<i>Heat shock protein 70</i>)
I	spin jádra
ICG	indocyaninová zeleň (<i>Indocyanine green</i>)
IgG a IgM	imunoglobuliny G a M
M	magnetizace
MR	magnetická rezonance
MRI	zobrazování magnetickou resonancí (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
NBC	Nobelova cena
NIR	oblast blízkého infračerveného záření (<i>Near Infrared</i>)
NMR	nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PAA	polyakrylová kyselina
PET	pozitronová emisní tomografie (<i>Positron emission tomography</i>)
QDs	kvantové tečky (<i>Quantum Dots</i>)
R_1, R_2	relaxivita R_1 a R_2
RF	radio-frekvenční (<i>radio-frequency</i>)
RhoA	Ras homolog genové rodiny A (<i>Ras homolog gene family, member A</i>)
RITC	rhodamin B isothiokyanát
RTKs	tyrosinkinázové receptory (<i>Receptor tyrosine kinases</i>)
SPECT	tomografická scintigrafie (<i>Single-photon emission computed tomography</i>)
SPIO	superparamagnetické nanočástice na bázi oxidů železa

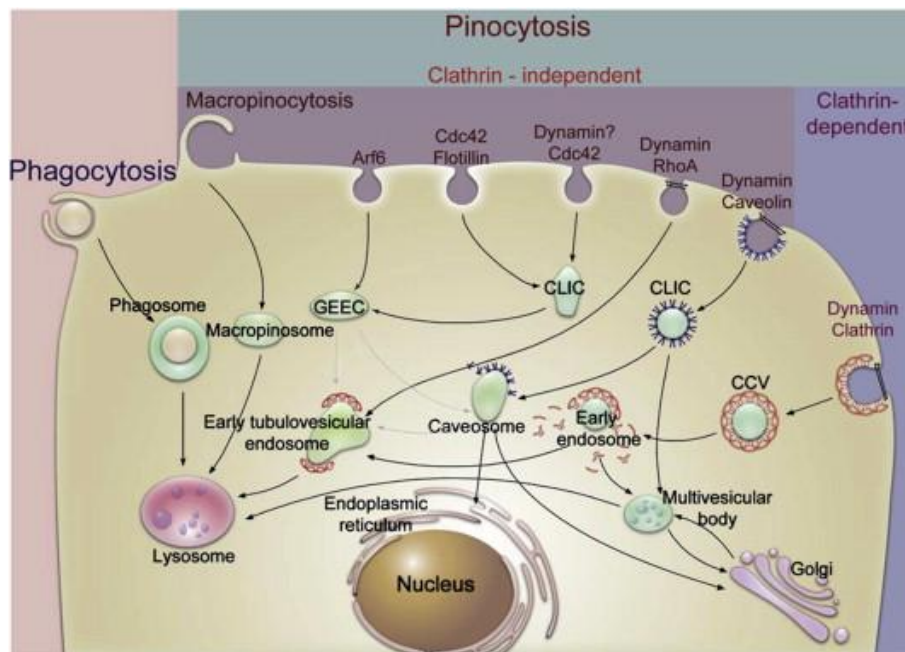
(*Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)

SRs	scavengerové „zametací“ receptory (<i>Scavenger receptors</i>)
SV40	opičí polyomavirus 40 (<i>Simian virus-40</i>)
T_1 a T_2	T_1 neboli longitudinální (podélný) relaxační čas, T_2 neboli transverzální (příčný) relaxační čas
UV	oblast ultrafialového záření (<i>Ultraviolet</i>)
VIS	oblast viditelného světla (<i>Visible light</i>)
x, y, z	souřadnice kartézského systému
ω_0	frekvence

1. Vezikulární transport (*Vesicular trafficking*)

V extracelulárním prostoru buňky mohou nanočástice (a další látky) interagovat s vnějším povrchem plazmatické membrány – vazba na buněčný povrch umožní jejich vstup do buňky tzv. procesem endocytózy. V prvním kroku dochází k vychlívění membrány, která příslušnou částici obalí; uzavřením membrány pak vzniká intracelulární váček zvaný endozom. Obsah endozomu je následně dopraven do specializovaných vezikulárních struktur. Zde je obsah váček roztříděn a nasměrován do cílových míst, jimiž mohou být jednotlivé buněčné kompartmenty, případně může být obsah váček recyklován zpět do extracelulárního prostoru nebo transcytován napříč buňkou.[1]

Látky mohou do buňky vstupovat několika různými mechanismy (Obr. 1). Endocytózu je možné rozdělit do několika základních velkých skupin, a to na fagocytózu neboli „buněčné jedení“ (typ endocytózy, při kterém jsou pohlcovány velké částice) a na pinocytózu neboli „buněčné pití“ (typ endocytózy, při kterém jsou přijímány tekuté a rozpuštěné látky), přičemž fagocytózu vykazují spíše specializované savčí buňky, zatímco pinocytóza je typická pro všechny buněčné typy. Dalšími typy endocytózy buňka pohlcuje menší množství extracelulárního materiálu a uplatňují se při nich nejruznější molekulární mechanismy – viz Obr. 1.[2]

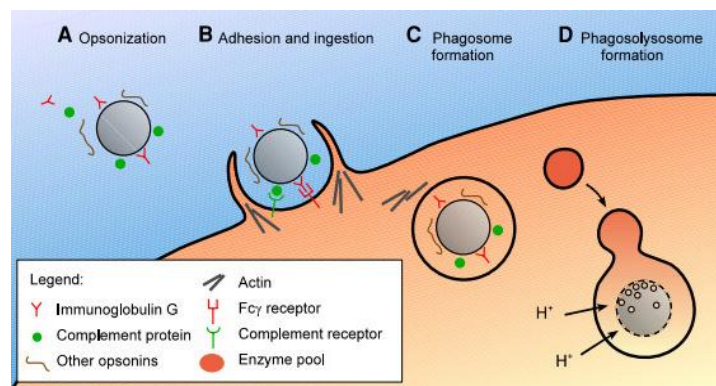


Obr. 1: Mechanismy endocytózy zahrnující nejruznější cesty vstupu pevných částic a rozpuštěných látek dovnitř buňky. Zkratky: CCV – clathrin coated vesicles (váček obalený klatrinem), CLIC – clathrin-independent carriers (transport nezávislý na klatrinu), GEEC – GPI-enriched early endosomal compartmentsment (GPI obohacené časné endozomy), GPI – glycosphosphatidylinositol; Obr. 1 převzat z [1]

1.1. Fagocytóza

Fagocytóza má zásadní význam při fyziologické obraně organismu vůči cizorodým elementům, např. většině bakterií a některým virům i při pohlcování inertních částic včetně např. nanočástic s obsahem léků.[3]

Fagocytóza zpravidla probíhá ve specializovaných „profesionálních“ fagocytech, jako jsou makrofágy, monocyty, neutrofilů a dendritické buňky. Fagocytická aktivita se však v menší míře může vyskytnout i u tzv. „neprofesionálních“ fagocytů, kam můžeme zařadit např. fibroblasty, epitelální a endotelální buňky.[3,4]



Obr. 2: Průběh opsonizace zakončený fagocytózou A) opsonizace částice imunoglobuliny, proteiny komplementu a jinými opsoniny v krevním řečišti; B) interakce opsonizované částice s povrchem buňky, aktivní pohlcení částice; C) vznik fagozomu, který se slučuje s lyzosemem za vzniku fagolysosomu; D) fagolysosom náchylný k degradaci; Obr. 2 převzat z [3]

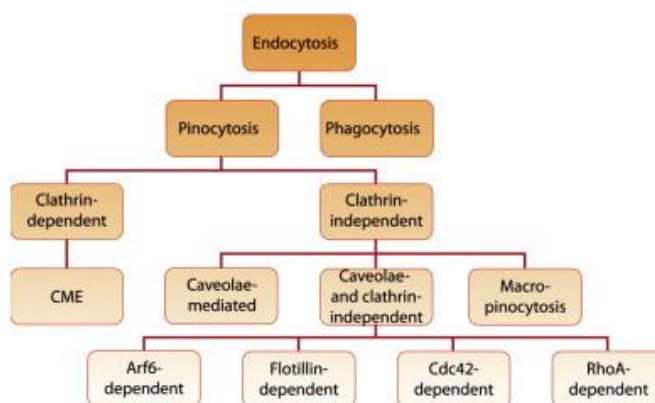
Vstup částice do buňky prostřednictvím fagocytózy sestává ze tří kroků: v první řadě musí dojít k rozpoznání částice opsonizací v krevním řečišti; následně musí rozpoznaná částice přilnout k buněčné membráně; a nakonec musí být částice buňkou pohlcena.[3]

Rozpoznání cizích částic založené na opsonizaci spočívá v označení těchto částic bílkovinami zvanými opsoniny (Obr. 2A). Takto označené částice se stávají „viditelnými“ pro makrofágy, a tudíž mohou interagovat s příslušnými receptory a být následně fagocytovány. Proces opsonizace může být zprostředkován kromě opsoninů také proteiny komplementu (C3, C4 a C5), imunoglobuliny (IgG a IgM) a dalšími proteiny krevního séra, jako jsou např. laminin, fibronektin nebo kolagen I.[5] Částice označené opsoniny následně interferují s receptory na povrchu buňky prostřednictvím interakce receptor-ligand (Obr. 2B) a vstupují do buňky. Mezi hlavní receptory účastníci se fagocytózy patří Fc receptor (FcR) a komplementový receptor (CR). Na fagocytóze nanočástic se mohou podílet i další receptory, jako je např. manózový receptor (MS) nebo scavengerové („zametací“) receptory (SRs).[4,6] Po požití částic se uvnitř buňky vytvoří fagozom, jenž pohlcený obsah transportuje do

cytoplazmy (Obr. 2C).[3] Obsah váčku je různě štěpen a fúzován, díky tomu příslušný fagozom postupně dozrává a mění se nejdříve v časný endozom a následně v pozdní endozom, který nakonec splyne s lyzosemem za vzniku fagolyzosomu (Obr. 2D); v něm je přijatý obsah definitivně rozložen.[4]

1.2. Pinocytóza

Pohlcování tekutého materiálu (významné pro vstup nanočástic, které se neváží na buněčný povrch specifickou nebo nespecifickou interakcí) – pinocytóza může probíhat v zásadě nejméně čtyřmi mechanismy, a to a) klatrinem zprostředkovanou endocytózou (CME); b) kaveoly zprostředkovanou endocytózou (CvME); c) makropinocytózou a d) endocytózou nezávislou na klatrinu a kaveolech (Obr. 3).[2]

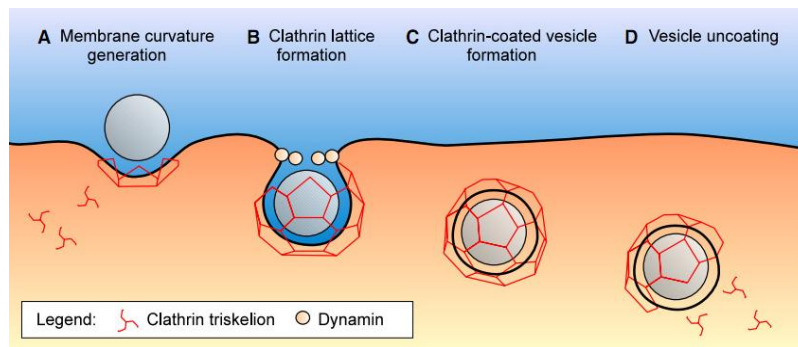


Obr. 3: Klasifikace endocytózy; Obr. 3 převzat z [1]

1.2.1. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza (CME)

Ve všech typech savčích buněk se uplatňuje endocytóza zprostředkovaná pomocí klatrinu (CME), která se podílí na klíčových fyziologických procesech, jako je příjem živin nebo vnitrobuněčná komunikace. Vstup částic do buňky je dán specifickou interakcí receptor–ligand. K této interakci dochází na specifických místech povrchu buněčné membrány, jež jsou bohatá na klatrin (hlavní cytosolický obalový protein). Tvorba klatrinového váčku je založena na polymerizaci klatrinových jednotek, které vytvářejí strukturu podobnou košíku (Obr. 4).[3] Jednotka klatrinu se nazývá triskelion a podobá se třínohému větrníku (ten odpovídá třem identickým klatrinovým těžkým řetězcům). Právě tyto jednotky umožňují tvorbu polyhedrálních klecí.[7] Po vzniku takovéto klece se u jejího ústí začnou shromažďovat molekuly dynaminu, ty následně umožní odštěpení vznikajícího váčku a jeho průchod dovnitř buňky. Váček se následně označuje jako časný endozom. Po odštěpení váčku od plazmatické

membrány dochází k rozkladu jeho klatrinového obalu působením např. heat shock proteinů (Hsp70). Jednotky rozložených klatrinových obalů pak mohou být znova použity k výstavbě nových váčků. Časné endozomy posléze dozrávají v endozomy pozdní. Obsah váčků může být buďto recyklován prostřednictvím sortujících endozomů nebo může být dále zpracováván cestou určenou k degradaci v lyzosomech.[8] Degradace v lyzosomech je důležitá pro nanočástice nesoucí léky, neboť umožňuje, aby byly vystaveny kyselému pH a příslušným lyzosomálním hydrolázám, které při použití vhodného chemizmu zaručí, že část jejich obsahu se uvolní do cytoplazmy.[3]



Obr. 4: Průběh endocytózy závislé na klatrinu a) tvorba endohedrálční mřížky z triskelionů; b) po zformování klatrinové mříže do podoby koše přistupuje dynamin, který zajišťuje štěpení membrány; c) dochází k uvolnění cytosolických klatrinových váčků; d) následné obnažení váčku umožňuje recyklaci klatrinových triskelionů; Obr. 4 převzat z [3]

1.2.2. Kaveoly zprostředkovaná endocytóza (CvME)

Kaveoly jsou přítomny v nejrůznějších buněčných typech, jako jsou hladké svalové buňky, fibroblasty, endoteliální buňky a tukové buňky. Jsou to v podstatě vychlípeniny ve tvaru baňky nacházející se na buněčné membráně. Ty mohou mít 60 až 80 nm v průměru a mohou zaujímat i víc jak třetinu povrchu plasmatické membrány. Pro utváření kaveol je nezbytný protein kaveolin-1. Díky svému uspořádání mohou kaveoly pohlcovat nejrůznější částice, které se navážou na jejich povrch.[9] Po té, co jsou částice navázány na povrch buňky, putují po plasmatické membráně laterální difuzí, dokud nedojde k jejich lokalizaci v endocyticky aktivní kaveole.[8] Následné odštěpení kaveolů z membrány je zprostředkováno prostřednictvím dynaminu (GTPáza), umožňujícího vytvoření cytosolického kaveolárního váčku, z něhož později vzniká takzvaný kaveozom. Kaveozomy neobsahují žádné lyzosomální enzymy, což je činí ideálními pro transport vybraných nanočástic nesoucích léky případně jiné látky, jako jsou peptidy, bílkoviny, nukleové kyseliny apod., vesměs velmi citlivé na působení degradačních enzymů.[3]

1.2.3. Makropinocytóza

Makropinocytóza je zvláštní případ na aktinu závislé endocytózy, při které dochází k internalizaci tekutiny a plazmatické membrány do velké vakuoly zvané makropinozom. Spouštěčem makropinocytózy je vnější podnět v podobě růstového faktoru, jenž má za úkol aktivovat tyrozinkinázové receptory (RTKs). Tyrozinkinázové receptory postupně spouští signalizační kaskádu, která aktivuje přestavbu aktinových filament, díky čemuž dochází ke zvlnění membrány a vytváření extenzivních vychlípení. Tyto změny na membráně pak slouží k pohlcení okolní tekutiny a živin z extracelulárního prostředí.[10]

Tuto cestu příjmu poměrně velkých částic mohou využívat především buňky postrádající fagocytózu. Makropinocytóza může také sloužit jako nespecifické vstupní místo pro nanomateriály využívající více mechanismů pro vstup do buňky.[1] Buňkami, které pohlcují extrémně velké množství extracelulárního materiálu pomocí makropinocytózy, jsou dendritické buňky; pohlcený materiál následně slouží k prezentaci antigenů prostřednictvím molekuly MHC II. třídy. Správně designované nanočástice (pro vstup do buňky prostřednictvím makropinocytózy), tak mohou být vhodnými vektory pro modulaci antigenní prezentace.[11]

1.2.4. Endocytóza nezávislá na klatrinu a kaveolech

Vstup částic do buňky zprostředkované jinými cestami, než endocytózou závislou na klatrinu nebo kaveolech, je závislý na cholesterolu a vyžaduje vesměs specifické lipidické složení. Těmito cestami může být transportována do buňky např. extracelulární tekutina, SV40 (simian virus-40), CTxB (cholera toxin B), GPI vázané proteiny, interleukin-2, růstové hormony apod. Transport vyžaduje specifické efekторы, podle nichž, je možné jednotlivé cesty vstupu rozdělit, a to na Arf6 závislé, flotilin závislé, Cdc42 závislé a RhoA závislé (obr. 3).[12]

Není známo mnoho nanomateriálů, které by pro vstup do buňky využívaly endocytózu nezávislou na klatrinu nebo kaveolech. Mezi tyto nanomateriály patří např. nanočástice a polymery modifikované folátem.[1] Mnohé lidské nádorové buňky zpravidla exprimují vysoké hladiny folátových receptorů, čehož se dá využít při léčbě nádorových onemocnění. Léčebná agens tak mohou být cíleně a efektivně transportována do cytoplazmy nádorových buněk.[13]

2. Metody značení buněk

Populace buněk je možné označit pomocí kontrastních látek. V dnešní době existuje mnoho způsobů značení buněk, které jsou založeny na nejrůznějších specifických a nespecifických značících metodách. Jednotlivé metody mohou být založeny na různých biologických a biochemických principech, většinou však dochází k příjmu kontrastního agens procesem endocytózy, popř. přímou interakcí s plazmatickou membránou.[14]

2.1. Nespecifické značení buněk

Nespecifické značení buněk využívá sondy obecně vstupující do buněk bez ohledu na jejich přesný typ či diferenciační stadium. Tento typ značení je tedy v zásadě vhodný pro všechny typy buněk, a lze jej využít jak při studiu buněk *ex vivo*, tak i při studiu buněk *in vivo*. Nespecifickou metodou mohou být označeny jednak smíšené a nedefinované buněčné populace, ale i populace definovaných a čistých buněčných linií. Nespecifické metody značení buněk lze dále rozdělit na metody přímé a nepřímé.[14]

Přímé metody značení buněk, na rozdíl od metod nepřímých, zpravidla nevyžadují vnější zásah (jakým je např. elektroporace) pro vstup kontrastního agens dovnitř buněk; k příjmu kontrastní látky většinou dochází na základě endocytózy. Neexistuje ostrá hranice mezi oběma typy značení – např. transfekce je značící metodou, která se nachází na pomezí přímého a nepřímého značení buněk.

Přímé značení buněk je nejjednodušší a nejpřímočařejší cestou značení buněk.[15] Metody přímého buněčného značení vychází z principů histologického značení buněk. Metoda umožňuje specificky (dle konkrétního chemizmu – zpravidla typu náboje) zobrazit buňky v jednotlivých orgánech, avšak v rámci všech buněčných typů přijímajících agens dochází k nespecifickému značení buněk.[14] Výhodou těchto metod je snadná proveditelnost a finanční nenáročnost. Nejjednodušší přístup spočívá v inkubaci buněk s kontrastní látkou, která do buňky vstupuje přes buněčnou membránu procesem endocytózy, u fixovaných buněk je vyžadována permeabilizace (pomocí detergentů, alkoholů nebo rozpouštědel).[16]

Nepřímé buněčné značení (využívající specifických technik umožňujících vstup sond do buňky, nezávisle na endocytických procesech a chemizmu plasmatické membrány) vyžaduje mnohem složitější metodologické přístupy založené na genovém inženýrství.[17]

2.1.1. Značení buněk pomocí radioizotopů

Značení buněk pomocí radioizotopů patří mezi klinicky nejstarší metody používané ke značení buněk. Jedním z prvních radioizotopů, jenž byl použit v praxi, byl radioizotop india 111, který má relativně dlouhý poločas rozpadu ($T_{1/2} \approx 2,8$ dne), díky tomu je možné buňky sledovat pomocí tomografické scintigrafie (SPECT) po dobu 5 až 7 dnů.[16] K označení buněk dochází přímou kultivací buněk s komplexem označovaným jako ^{111}In -oxin [tris(8-hydroxychinolinát)inditý]. Téměř veškeré množství radioizotopu je přijato buňkami již během prvních 15 minut inkubace.

Z pokusů, při nichž byl použit ^{111}In -oxin vyplývá, že se účinně váže na buňky, a že alespoň část těchto radioizotopů opouští buňky postupně. Dále se ukázalo, že se radioizotopy vážou k nejrůznějším intracelulárním komponentám, a poskytují tak stabilní označení buňky.[18]

2.1.2. Značení buněk pomocí kontrastních látek pro MRI

Buňky označené magnetickými kontrastními látkami lze sledovat *in vivo* pomocí MRI (zobrazování magnetickou rezonancí). Studium buněčných populací pomocí této metody umožňuje lepší pochopení procesů buněčného transportu. Toho se dá následně využít např. při léčbě nádorů, při sledování chování tkáňových transplantátů nebo ve vývojové biologii. Intenzita MR signálu závisí na koncentraci přidané kontrastní látky a na typu použité buněčné linie.[19]

Kontrastní látky, resp. magnetické nanočástice, určené pro *in vivo* zobrazování magnetickou rezonancí by v ideálním případě měly kombinovat optimální magnetické vlastnosti se stabilitou a biokompatibilitou. Tyto vlastnosti mohou být v konečném důsledku ovlivněny výslednou velikostí částic, jejich složením, krystalinitou, morfologií povrchu a povrchovými úpravami. Nanočástice zpravidla potřebují mít kolem svých magnetických jader obal bránící jejich agregaci ve vodném prostředí; tento obal by měl současně zajišťovat také stabilitu a biokompatibilitu nanočástic. Jako obalové materiály mohou sloužit nejrůznější organické ligandy, malé molekuly stabilizující náboj, polymery nebo anorganické materiály. Charakter obalu bude ovlivňovat přístup vody k magnetickému jádru, díky čemuž bude ovlivněna i relaxivita a výsledná účinnost kontrastní látky.[20]

Při MRI sledování nesmrtelných buněčných linií se však setkáváme s jistým omezením, které vyplývá z vlastností těchto neustále se dělících buněk. Nesmrtelné buněčné linie *in vivo* totiž velmi rychle proliferují, což postupně vede k rozředování intracelulárně přijatých kontrastních látek (což je obecný problém při použití sond). Takto nařaděná

kontrastní agens poskytují mnohem slabší signál, než který je potřeba k detekci metodou MRI.

Rozředění pohlcených částic kontrastní látky během proliferace se projevuje nejen u nediferencovaných buněčných linií, nýbrž i u buněčných linií, které diferenciaci podléhají. Rozdíl mezi těmito dvěma typy buněčných linií však spočívá v distribuci kontrastní látky uvnitř dělicích se buněk, přičemž u nediferencujících buněčných linií, dělicích se symetricky, dochází k symetrické distribuci kontrastní látky mezi dceřiné buňky. Zatímco u diferencujících buněčných linií, dělicích se asymetricky, dochází k asymetrické distribuci kontrastní látky mezi dvě nově vznikající buňky. Díky tomu některé buňky mohou obsahovat většinu kontrastního agens, zatímco jiné buňky jej mohou obsahovat minimum nebo vůbec žádné.[21]

2.1.3. Značení buněk pomocí kvantových teček

Kvantové tečky (QDs) jsou nanokrystalické polovodiče,[22] které se používají jako fluorofory v nejrůznějších biologických aplikacích. Základem kvantových teček je nejčastěji jádro z CdSe pokryté vrstvou sulfidu zinečnatého. Vrstva ZnS pasivuje povrch jádra, čímž jej chrání před oxidací a snižuje jeho toxicitu.[23]

Výhodou kvantových teček je jejich schopnost emitovat záření o konkrétních vlnových délkách spektra (v závislosti na jejich velikosti), přičemž toto záření mohou emitovat po dobu až několika týdnů;[22] jsou totiž mimořádně odolné vůči tzv. photobleachingu (fotolytické degradaci).[24] Kvantové tečky jsou chemicky inertní a nemají negativní účinky na buňky ani na jejich vývoj, neškodné jsou také při použití na zvířatech. Podobně jako jiné fluorofory mohou být i kvantové tečky specificky zacíleny proti rakovinným buňkám v těle, a to vhodnou konjugací s peptidy či protilátkami.

Kvantové tečky, díky svým optickým vlastnostem, velmi snadno předčí běžně používané organické fluorescenční látky, které jsou schopné fluorescence pouze po několik málo minut.[22]

2.1.4. Transfekce

Jedním z přístupů nespecifického nepřímého značení buněk je použití transfekčních činidel. Prostřednictvím transfekce je možné velmi účinně zabudovat značku prakticky do jakéhokoliv typu buněk. Ovšem jedná se o mnohem složitější metodu buněčného značení, než jsou metody založené na zabudování kontrastních látek pomocí prosté endocytózy. Navíc některá transfekční činidla mohou být toxická.[16]

Ideální transfekční činidlo by mělo mít vysokou transfekční účinnost, nemělo by být cytotoxické a mělo by být použitelné pro široký repertoár buněk.[25] Tyto vlastnosti splňuje např. lipofectamin, což je běžně používané transfekční činidlo, které zprostředkovává vazbu komplexu k buněčné membráně pomocí kladného náboje; následně dochází ke vstupu komplexu do buňky procesem endocytózy.[14]

Transfekce s použitím reportérových genů (např. fluorescenčních proteinů) umožňuje spolehlivou, stabilní a neškodnou vizualizaci buněčných funkcí v cílovém místě.[26] Reportérové geny exprimují enzymy nebo proteiny, které mohou být posléze detekovány. Výhodou je dlouhotrvající genová exprese, na kterou nemá vliv buněčná proliferace. Z těchto důvodů lze buňky označené transfekcí sledovat v zásadě po neomezeně dlouhou dobu (danou počtem buněčných dělení). Další výhodou je, že k expresi reportérových genů dochází pouze v živých buňkách. Navíc lze reportérový gen regulovat specifickým promotorem; jehož sepnutí je závislé např. na nástupu diferenciace kmenové buňky.[15]

2.1.5. Elektroporace

Dalším způsobem, kterým mohou kontrastní látky vstoupit do buněk, je metoda tzv. elektroporace,[14] jež vyvolává vratné elektromechanické změny permeability v buněčných membránách.[27] Princip metody vychází z aplikace krátkých elektrických impulzů, které dočasně zvyšují propustnost membrány.[28] Vliv elektrického pole způsobí rozdíl transmembránového potenciálu, díky čemuž v některých místech membrány dochází k dočasnému rozrušení a ke vzniku pórů.[29] Skrz tyto póry je pak přechodně umožněna výměna látek. Důležité je, že během elektroporace nedochází k významnému poškození membránových struktur.[28] Lokalizace kontrastních látek přijatých elektroporací závisí na typu použitého kontrastního agens.[14] Zatímco nanočástice, jako např. Feridex (komerční superparamagnetické nanočástice na bázi oxidů železa), využívají po vstupu do buňky některou z cest endocytózy,[27] tak malé molekuly, jako např. Gd-HP-DO3A (komplex gadolinia) zůstávají po elektroporaci v cytosolu buňky.[30]

Elektroporaci lze velmi dobře využít u těžko transfekovatelných buněčných typů, jako jsou např. některé bílé krvinky nebo embryonální kmenové buňky.[27] Elektroporace je v zásadě jednoduchá, snadno aplikovatelná a velmi efektivní metoda umožňující vstup látek do buňky.[28]

2.1.6. Genové pistole (*Gene guns*)

Pomocí této techniky je možné zavést dovnitř buněk, tkání nebo organel genetický materiál, ale například i kontrastní látky pro MRI, včetně nanočástic. Materiál určený k internalizaci je tlakem plynu vystřelen do buňky. Metoda značení buněk pomocí genových pistolí vyžaduje specializované zařízení a účinné značení je technicky náročné. Tento způsob značení buněk nenese žádné zvláštní výhody a potenciální nežádoucí účinky dosud nejsou známé.[14] Pro některé typy organismů složených z buněk se silnou buněčnou stěnou je využití genových pistolí metodou první volby (rostliny, houby).¹⁾

2.2. Specifické značení buněk

Pomocí specifického značení buněk je možné cíleně označit konkrétní buňky ve smíšené buněčné populaci.[14] Zobrazení konkrétních buněk pomocí nanočástic, stejně jako nanočásticemi zprostředkovaný transport léků do vybraných buněk, zpravidla vyžaduje konjugaci s nějakým vektorem v podobě proteinu, nejčastěji monoklonální protilátky,[31] peptidu, aptameru (krátký oligonukleotid nebo peptid schopný zcela specifické vazby k cílové molekule) apod. V porovnání se značením buněk prostou endocytózou, vazba vektoru ke specifické buněčné struktuře (princip vazby receptor-ligand) výrazně zvyšuje účinnost buněčného značení. Nevýhodou je, že kontrastní látka může vstupovat i do jiných buněk (hlavně fagocytů), a to zejména v případech, kdy dojde k úmrtí prvotně označených buněk, jejichž ostatky jsou vzápětí endocytovány makrofágy.[14]

V nedávné době vzrostl v biologických aplikacích zájem o superparamagnetické mikrokuličky, které mohou být použity k magnetickému třídění a identifikaci buněk. Díky vysoké hodnotě magnetického momentu lze totiž mikrokuličky snadno detekovat pomocí vnějšího magnetického pole (pomocí MRI).[32] Mikrokuličky ve spojení s protilátkami, jež mají afinitu ke konkrétním buněčným strukturám, mohou být použity pro specifické značení buněk. Výhoda mikrokuliček navázaných na protilátky spočívá v možnosti jejich přímé inkubace s buněčnou kulturou, kde se váží na jejich povrch za vhodných podmínek (snížení teploty) nedochází k jejich vstupu dovnitř buněk, díky tomu nejsou buňky vystaveny potenciálním toxickým účinkům mikrokuliček. Nevýhodou může být, že interakcí s povrchem buňky může v některých případech (např. po vazbě na receptory smrti či jiné pro-apoptotické receptory) dojít k zahájení nežádoucích biochemických procesů včetně apoptózy.[14]

2.3. Cytotoxicita

Produkce nanočástic určených pro biomedicínské aplikace stále roste, z tohoto důvodu jsou nanočástice navrhovány tak, aby interakce s buňkami byla snadná a bez projevů nežádoucích účinků. Důležité je také znát cesty, kterými jsou nanočástice uvnitř buňky degradovány. V některých případech totiž může docházet k akumulaci degradovaných nanočástic v buňce, což má za následek změny v intracelulárním prostředí, jako jsou např. změny genetického kódu či narušení integrity organel.

Experimenty probíhající v *in vitro* podmínkách nekladou příliš vysoké požadavky na případnou cytotoxicitu nanočástic. Naproti tomu *in vivo* aplikace vyžadují důkladné pochopení kinetiky a toxikologie používaných nanočástic.[31] Míru cytotoxicity *in vitro* lze stanovit pomocí nejrůznějších testů vycházejících ze zjišťování počtu přežívajících buněk (viabilita buněk), sledování jejich proliferace a buněčných funkcí.[14] Při studiu cytotoxicity je důležité, aby zjištěná úmrtnost buněk odpovídala toxicitě nanočástic, nikoliv změnám vnějšího prostředí, jako je např. kolísání teplot, změny pH, nedostatek živin apod.

Nejjednodušší způsob, jakým lze míru cytotoxicity zjistit, je vizuální kontrola proliferace buněk pomocí světelné mikroskopie. Běžně jsou používány také barevné testy zjišťující míru integrity plazmatické membrány a intenzitu mitochondriální činnosti. Barevné cytotoxické testy vycházejí z použití barviv, jako je např. neutrální červeň nebo trypanová modř. Neutrální červeň je organické barvivo s kladným nábojem, které může difundovat skrz plazmatickou membránu, přičemž má tendenci se hromadit v lyzosomech uvnitř živých buněk. Toto barvivo nevstupuje do buněk, jejichž membrána je poznamenána patologickými změnami (umírající a mrtvé buňky). Naproti tomu trypanová modř je záporně nabitě organické barvivo, které vstupuje výhradně do mrtvých buněk; živé buňky zůstávají neobarvené.[31] Viabilitu buněk lze následně zjistit spočítáním buněk pomocí světelné mikroskopie. V případě použití fluorescenčních barviv (jako je např. propidium jodid nebo ethidium homodimer-1 vstupující přes membránu pouze do mrtvých buněk), lze viabilitu zjistit pomocí fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie.[14]

Nevýhodou studia toxicity na buněčných liniích je jeho obtížnost vyplývající ze skutečnosti, že jednotlivé výzkumné týmy mohou používat různé kultivační podmínky; často se liší typem používané buněčné linie, koncentrací přidávaných nanočástic a dobou, po kterou jsou buňky s nanočásticemi inkubovány. Ale i přesto je využívání buněčných linií při studiu cytotoxicity mnohem výhodnější než experimenty prováděné na zvířatech, neboť v případě buněk se experimentální podmínky dají lépe kontrolovat, experimenty jsou reprodukovatelné, jsou levnější a odpadají zde etické problémy.[31]

3. Studium buněk *in situ*

V současné době vzrostl zájem o používání buněk jako transportérů léčebných agens, díky tomu došlo také k rozvoji neinvazivního zobrazování buněk *in vivo*. [14] Sledování buněk *in vivo* umožňuje studium základních molekulárních procesů na úrovni molekul, buněk, tkání a orgánů bez interpretačních komplikací možnými experimentálními artefakty. [33]

Ideální zobrazovací metoda by měla být biokompatibilní a netoxická, neměla by způsobovat žádné genetické modifikace a poškození buněk, detekce by měla být snadná v jakékoli anatomické poloze a měla by umožnit kvantifikaci signálu a následně i počtu pozitivních buněk. Během proliferace buněk by nemělo docházet k extrémnímu naředění kontrastní látky, nemělo by také docházet k přenosu kontrastní látky do jiných buněk. Neinvazivní zobrazování by mělo být možné po několik měsíců až let. Metoda by v ideálním případě neměla využívat injekční podávání kontrastních látek. [34]

Vzhledem k tomu, že v dnešní době neexistuje kontrastní látka se všemi těmito vlastnostmi, [35] se k zobrazování často používají kombinace vlastností více typů kontrastních látek. [34]

Studium buněčných populací je v poslední době velmi rozšířenou problematikou; v souvislosti s tím dochází také k rozvoji zobrazovacích metod a příslušných kontrastních agens. Jelikož se tato práce zabývá značením buněk pomocí magnetických nanočástic, bude v této a následující kapitole věnována pozornost pouze vybraným zobrazovacím metodám, a to optickým metodám, průtokové cytometrii a MRI. Výběr metod vychází čistě z praxe. Vlastnímu použití připravených nanočástic, jako MRI kontrastních agens pro další výzkum či klinickou praxi, předchází zjištění vlivu nanočástic na buňky (vliv na proliferaci – optické metody, zjištění cytotoxicity – průtoková cytometrie) a následně ověření jejich magnetických vlastností (MRI).

3.1. Optické metody

Optické zobrazování představuje neinvazivní, netoxickou, poměrně univerzální a citlivou metodu (citlivost na úrovni jediné buňky je ve srovnání s MRI o několik řádů vyšší), která je zároveň levná a rychlá. [35]

3.1.1. Obecné principy

Zobrazování prostřednictvím optických metod je závislé na použité vlnové délce, na typu přístrojové techniky, která slouží k detekci, a na tom, zda je detekce ovlivněna přidáním

kontrastní látky. Při vlastní interakci světla v tkáni se pak uplatňují procesy, jako je absorpce, rozptyl fotonů a produkce fluorescenční emise. Použitá vlnová délka určuje, do jaké hloubky bude možné danou tkáň zobrazit (viz Tab. 1). V rozsahu UV-VIS vlnových délek (až do 650 nm) dochází k absorpci fotonů tkáňovými chromofory, jako je např. oxyhemoglobin a deoxyhemoglobin, pouze v prvních několika mikrometrech až milimetrech hloubky tkáně, zatímco v rozsahu vlnových délek blízkého infračerveného záření (NIR, 700 až 900 nm) absorpce dosahuje do hlubších míst tkáně.

Tab. 1: *In vivo* optické zobrazovací techniky; Tab. 1 převzata a upravena z [33]

Technika	Vlnová délka	Kontrastní princip	Max. hloubka zobrazení
Mikroskopie (EPI-fluorescenční, konfokální, 2-fotonová)	VIS	autofluorescence, fluorescenční sondy	500 μ m
Optická koherentní tomografie (OCT)	VIS	rozptyl, odraz	2 mm
Laser speckle imaging	VIS, NIR	rozptyl, odraz	1 mm
Fluorescenční odrazové zobrazování	VIS, NIR	autofluorescence, fluorescenční sondy	~ 10 mm
Bioluminiscenční zobrazování	VIS	bioluminiscenční značky (luciferáza)	~ 3 cm
Difúzní optická tomografie (DOT)	NIR	rozptyl, vnitřní absorpce, absorpční agens	~ 12 cm
Fluorescenční molekulová tomografie (FMT)	NIR	fluorescenční agens	~ 12 cm
Vylepšená endoskopie/laparoskopie	VIS, NIR	vizuální kontrola, fluorescenční agens	~ 5 mm

Podobně jako v MRI lze docílit lepšího signálu použitím kontrastních látek, tak i u optických metod se dá intenzita signálu posílit použitím fluorescenčních barviv (fluoroforů). Ke kontrastu pak dochází na základě morfologických charakteristik vlastní tkáně. Mezi fluorescenční barviva patří např. indocyaninová zeleň (ICG) – první fluorescenční barvivo použité k diagnostice nádorů pomocí optických metod. Fluorescenční sondy je navíc možné vhodnou konjugací s malými molekulami či protilátkami, proteiny, peptidy apod. specificky zacílit na konkrétní molekulární struktury, které jsou v některých případech typické pro patologické stavy. Ke konjugaci s těmito biomolekulami se nejčastěji používají cyaninová fluorescenční barviva a deriváty na bázi rhodaminu nebo fluoresceinu.[33]

3.1.2. Výhody a nevýhody optických metod

Optické metody jsou nenáročné na vybavení, jsou relativně levné a všestranně použitelné.[33] Jedná se o rychlé a citlivé metody s multispektrálními schopnostmi.[14] K detekci signálu je možné použít kombinaci více prvků (např. současně lze měřit signál vnitřního absorpčního kontrastu a přidaného fluorescenčního agens). Další výhodou je, že fluorescenční signály v živých organizmech mohou být generovány opakovaně a po téměř libovolně dlouhou dobu.[33] Nevýhodou optických metod je jejich špatné prostorové rozlišení a omezená hloubka detekce.[14] Zkoumaná tkáň by proto neměla být v průměru větší než 10 cm. Nicméně i přes tato omezení našly optické metody své uplatnění např. v diagnostice karcinomu prsu pomocí optické tomografie (optické mamografie).[33] Řada aplikací, např. studium invazivity nádorů, využívá celoorganismální fluorescenční mikroskopii, která v této oblasti výzkumu významně zjednodušila a ekonomizovala identifikaci protinádorových léčiv.[36] Významnou technologií jsou tzv. vícefotonové mikroskopy využívající propustnosti tkání v infračervené oblasti spolu s faktem, že při dostatečně vysoké hustotě toku fotonů dochází k simultánní absorpci více než jednoho fotonu jedním fluoroforem a následné emisi ve viditelné oblasti spektra.[37,38]

3.2. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (*Flow cytometry*), využívající přístroj FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), je technika umožňující analýzu četných parametrů jednotlivých buněk v rámci různorodých populací. Pomocí průtokového cytometru je možné detekovat buňky typicky od 1 μm do 15 μm , a při vhodném nastavení, je možné detekovat částice i o velikostech mimo tento rozsah. Tato technika se s úspěchem používá v aplikacích, jako je např. imunofenotypizace (rozlišení jednotlivých buněčných populací na základě jejich označení příslušnými antigeny), počítání buněk, analýza exprese GFP, měření apoptózy apod.

Princip analýzy spočívá v průchodu tisíců buněk za sekundu skrz laserový paprsek, přičemž kolmo a přímo orientované fotodetektory zachycují fotony (rozptyl a fluorescenci) vycházející z každé buňky, jež projde skrz laser. Je důležité, aby buňky procházely laserovým paprskem postupně (jedna po druhé); toho lze docílit procesem tzv. hydrodynamického zaostření, kdy je roztok vzorku vstříknut do okolní proudící kapaliny, díky čemuž dojde k usměrnění toku jednotlivých buněk. Buňka procházející skrz laserový paprsek láme světlo, nebo jej rozptyluje všemi směry. Množství odraženého světla v přímém směru (*forward scatter*), následně přijaté detektorem, je přibližně úměrné velikosti buňky prošlé laserem (malé buňky produkují malé množství rozptýleného světla, velké buňky produkují velké

množství rozptýleného světla). Množství rozptýleného světla v postranním směru (*side scatter*), posléze přijaté detektorem, odpovídá strukturní složitosti a granularitě uvnitř buňky. Na základě množství rozptýleného světla v přímém a postranním směru pak lze získat současně informaci o velikosti a vnitřní složitosti jednotlivých buněk v rámci buněčné populace.

I v průtokové cytometrii lze využít kontrastní látky na bázi fluoroforů. Po konjugaci fluorescenční látky s příslušnou biomolekulou (např. protilátkou) může být výsledný konjugát přidán k buněčnému vzorku. Protilátky se poté specificky navážou na cílová místa, jež se nacházejí uvnitř buňky nebo na jejím povrchu. Zkoumaná buněčná populace může být označena i více než jedním typem fluorescenční látky. Jakmile buňka projde laserovým paprskem o správné vlnové délce, detektor postranního rozptylu (*side scatter*) zachytí emitovaný fluorescenční signál, který následně prochází přes řadu filtrů a zrcadel až k cílovým detektorům pro jednotlivé vlnové délky. Výslednou analýzou je tak možné získat informaci o intenzitě fluorescence jednotlivých buněk v rámci buněčné populace.

Získaná data tedy podávají informaci nejen o velikosti buněk, o jejich složitosti, fenotypu a kondici, ale také o dalších buněčných charakteristikách.²⁾

3.3. MRI

Pomocí neinvazivní techniky magnetické rezonance (MRI) je možné sledovat migraci buněk *in vivo* s vynikajícím časovým a prostorovým rozlišením.[39] MRI umožňuje dvojrozměrné a trojrozměrné zobrazování vnitřních částí pevných látek nebo živých organismů. K tvorbě obrazu dochází na základě detekce signálů nukleární magnetické rezonance (NMR) jader vybraných typů atomů, jako je např. ^1H , ^{19}F nebo ^{31}P . Ke kódování NMR signálů, nesoucích prostorovou informaci, magnetická rezonance využívá gradientů magnetického pole.[40] MRI je běžně používanou zobrazovací technikou v klinické praxi, která je mnohdy citlivější při identifikaci počínajícího onemocnění, než je stanovení diagnózy na základě pozorovatelných symptomů.[41]

Zobrazování pomocí metody MRI je klíčové pro tuto Bc. práci, a proto bude této technice věnována větší pozornost v samostatné kapitole.

4. MRI (zobrazování magnetickou rezonancí)

MRI (*Magnetic resonance imaging*) je neinvazivní zobrazovací metoda, která na základě měření relaxivit vodíkových jader molekul vody poskytuje fyziologické a patologické informace o živé tkáni. MRI poskytuje vysoký kontrast měkkých tkání, a hluboké tkáně dokáže zobrazit s vysokým rozlišením.[42]

4.1. Historie MRI

Počátek vzniku této metody sahá až do 20. let minulého století, kdy W. Pauli vyslovil myšlenku, že by elementární částice mohly mít vnitřní moment hybnosti neboli spin. V té době proběhla také první měření spinové resonance, na jejichž provedení se podíleli O. Stern a I. I. Rabi, kteří dokázali, že některá atomová jádra v silném magnetickém poli absorbují radio-frekvenční energii. V pozdějších letech proběhly experimenty dokazující, že spinovou rezonanci lze detekovat také mezi jadernými spiny v kompaktní hmotě (F. Bloch a E. M. Purcell – NBC za fyziku roku 1952). Těmito experimenty byl položen základ nukleární magnetické rezonance (NMR).

Během 50. let nastal boom v používání NMR. Své uplatnění tato metoda našla nejen v chemii, ale také v biologii, kde proběhly první pokusy na živých systémech. Studium tkání probíhalo na základě měření signálu vodíkových jader molekul vody.[43] Z počátku se tato metoda založená na měření vodíkových jader zdála být ve svém principu omezená, neboť síla signálu vyplývající z obsahu vody v jednotlivých tkáních se mezi těmito tkáněmi lišila jen velmi málo.[44] Během 70. let se však ukázalo, že v některých tkáních se mohou objevit rozdílné relaxační časy měřených vodíkových atomů, které poukazují na to, že daná tkáň je postižena nějakou patologií.[43] Díky této znalosti byl posléze jeden z hlavních výzkumů zaměřen na *in vivo* studie zhoubných nádorů, neboť tyto nádory prokazatelně poskytovaly rezonanční signály vodíkových jader s mnohem delším T_1 relaxačním časem, než jim odpovídající zdravé tkáně.[45]

Vlastní realizovatelnost MRI demonstroval až P. C. Lauterbur (NBC za medicínu roku 2003) prostřednictvím svého zeugmatografu (jedné z prvních verzí dnešního MRI), na němž také prokázal důležitost vlivu relaxačních časů na tuto techniku.[44] Pro tvorbu vlastního MRI obrazu bylo důležité zavedení techniky pulzních sekvencí (sled radio-frekvenčních (RF) pulzů a následných měření RF signálu vydávaného relaxující tkání³⁾), které definují, jakým způsobem jsou aplikovány radio-frekvenční pulzy (generující detekovatelné signály) a gradienty magnetického pole (poskytující prostorové kódování signálů).[46] Relaxace je jev,

který nastává poté, co na tkáň přestane působit RF pulz³⁾ (viz níže). Lauterbur vyšel z Rabiho experimentů, prováděných při identifikaci gyromagnetického poměru (poměr momentu magnetického pole a momentu hybnosti částice) jednotlivých prvků. Na základě těchto experimentů vyslovil myšlenku o použití magnetických gradientů ve třech různých směrech (x, y, z), díky kterým by každému bodu zkoumaného objektu bylo přiděleno magnetické pole s odlišnou intenzitou, přičemž každý bod objektu by produkoval unikátní radio-frekvenční signál. R. Ernst ukázal, že RF signály produkované jednotlivými objemovými elementy zkoumaného objektu mohou být přijaty a následně, Fourierovou transformací, může dojít k rozřídění signálů podle jejich intenzity, přičemž každá série signálů se zobrazí jako relativní jas na stupnici šedi. Na základě těchto skutečností bylo založeno prostorové a kvalitativní kódování MRI obrazu.[47]

Lauterbur byl mimo jiné také průkopníkem v úpravách intenzity signálu pomocí exogenních kontrastních látek.[44] Prováděl pokusy na vzorcích vody; přičemž vzorek obsahující čistou vodu poskytoval mnohem nižší signál, než vzorek, k němuž byla přidána kontrastní látka ve formě paramagnetických iontů Mn^{2+} pocházejících ze síranu manganatého. Přídavek kontrastní látky způsobil zkrácení relaxačního času T_1 , což vedlo k nárůstu signálu.[45]

Teprve v 80. letech došlo k hojnějšímu rozšíření MRI do klinické praxe; zde se stalo neocenitelnou pomůckou v diagnostice celé řady nejrůznějších onemocnění.[43]

4.2. Princip MRI

MRI (*Magnetic resonance imaging*) je zobrazovací technika založená na principu nukleární magnetické resonance (NMR).[48] Samotný princip spočívá v interakci aplikovaného magnetického pole s částicemi vlastními spin. Spin jádra je jednou z vlastností atomu, jehož hodnota je závislá na atomovém složení každého atomu (konkrétně na atomovém čísle a na hmotnosti jádra dané částice).

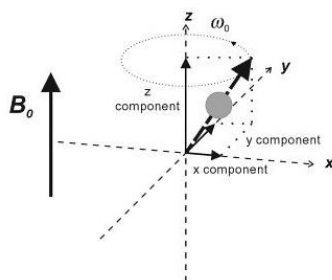
Jaderný spin I může v zásadě nabývat tří typů hodnot: 1) spin jádra nabývá hodnoty nula ($I = 0$) u atomů, které mají sudou hodnotu atomového čísla i atomové hmotnosti (např. $^{12}_6C$, $^{16}_8O$). Atomy s nulovou hodnotou jaderného spinu nemohou interagovat s vnějším magnetickým polem, a tudíž nemohou být studovány pomocí MRI. 2.) spin jádra nabývá celočíselné hodnoty ($I = 1, 2, 3 \dots$) u atomů s lichou hodnotou atomového čísla a se sudou hodnotou atomové hmotnosti (např. 2_1D , 6_3Li). 3.) spin jádra nabývá poločíselné hodnoty ($I = 1/2, 3/2, 5/2$) u atomů s lichou hodnotou atomové hmotnosti (např. 1_1H , $^{31}_{15}P$, $^{13}_6C$). Tato jádra

s nenulovým spinem mají také nenulový magnetický moment μ , který je základem magnetické rezonance (MR).

Nejčastěji měřeným jádrem MRI je jádro atomu vodíku ^1H , které je tvořeno pouze protonem, z čehož vyplývá i jeho poločíselná hodnota spinu ($I = 1/2$). Navíc se jedná o nejrozšířenější izotop vodíku, jenž má velmi silnou odezvu vůči aplikovanému magnetickému poli. Další výhodou použití vodíkových atomů v MRI vyplývá ze složení lidského těla, které je přibližně ze $3/4$ tvořeno vodou, díky tomu může být MR signál měřen přímo v tkáních.

V tkáni jsou, za normálních podmínek, jaderné spiny vodíkových atomů orientovány náhodně ve všech směrech. Výsledný součet vektorů těchto spinů (magnetických momentů) poskytuje nulovou hodnotu, která se v tkáni projeví nulovou magnetizací M . [49] Ovšem vlivem silného vnějšího magnetického pole dojde k uspořádání jaderných spinů vůči tomuto poli, a to buď paralelně, nebo antiparalelně. [48] Pokud je proton ozářen radio-frekvenční energií o správné frekvenci, je excitován z nižší-energetické hladiny do vyšší. Absorbovanou energii z RF pulzu poté protony uvolňují procesem zvaným relaxace. Při relaxaci dochází k uvolnění této nashromážděné energie z protonů, což vede k jejich navrácení do základního stavu (energetický stav před excitací). Jedná se o časově závislý proces, který je charakterizován rychlostní konstantou zvanou relaxační čas. V praxi se rozlišují dva druhy relaxačních časů, a to relaxační čas T_1 a relaxační čas T_2 . [49] Relaxační čas T_1 neboli longitudinální (podélný) relaxační čas je čas potřebný k návratu M_z vektorové složky magnetizace M na původní hladinu, zatímco relaxační čas T_2 neboli transverzální (příčný) relaxační čas je čas potřebný k návratu M_{xy} vektorové složky magnetizace M na původní hladinu. [48]

Pohyb každého protonu lze popsat systémem kartézských souřadnic, kde osy x a y jsou kolmé k magnetickému poli a osa z je k tomuto poli paralelní (Obr. 5). Tvorba MR pole je založena na magnetizaci, k níž dochází prostřednictvím pulzu radio-frekvenční energie. Během tohoto pulzu protony absorbují energii RF záření o dané frekvenci. Každý proton tak rezonuje na unikátní frekvenci, jež závisí na poloze uvnitř gradientu pole. Gradienty magnetického pole také využívají systém kartézských souřadnic, na kterém jsou založeny jejich vlastnosti, jako je směr a šířka gradientu. Tyto vlastnosti gradientů se podílí na tvorbě výsledného MR obrazu, a to tak, že určují orientaci a šířku jednotlivých řezů obrazu. Výsledný MRI obraz je složen z pixelů (obrazových bodů), které představují objemové elementy (voxely) tkáně. [49]



Obr. 5: Systém kartézských souřadnic vzhledem k aplikovanému magnetickému poli. Veličiny: x, y, z – osy souřadného systému, B_0 – magnetické pole, ω_0 – frekvence; Obr. 5 převzat z [49]

4.3. Kontrastní látky v MRI

Hlavní nevýhodou MRI je jeho nízká citlivost, tato vlastnost však může být výrazně vylepšena dodáním příslušné kontrastní látky (CA).

Kontrastní látky lze na základě relaxivit rozdělit na T_1 a T_2 kontrastní látky. T_1 kontrastní látky, takzvané pozitivní, zvyšují intenzitu signálu a poskytují tak jasnější obraz. Oproti tomu T_2 kontrastní látky, takzvané negativní, snižují intenzitu signálů a poskytují temnější obraz. K vlastnímu kontrastu pak dochází na základě interakce mezi vodíkovými protony vody a příslušnou kontrastní látkou.[42] Díky tomu je možné pozorovat rozdílné signály v rámci různých typů sousedících tkání.

Mezi hojně používané T_1 kontrastní látky patří paramagnetické komplexy gadolinia. Z T_2 kontrastních látek se nejčastěji používají nanočástice na bázi oxidu železitého,[48] a jiné superparamagnetické nanočástice zkracující T_2 relaxační čas.[50]

4.4. MRI v klinické praxi

Výhodou MRI je, že umožňuje diagnostikovat nepřeberné množství onemocnění již v počátečních stádiích jejich průběhu. Takto lze stanovit např. časná stádia roztroušené sklerózy, nádory mozku a hypofýzy nebo třeba natržené vazy v kloubech. Pomocí MRI je možno sledovat nejrůznější části lidského těla, ať už se jedná o mozek, páteř, klouby, šlachy, vnitřní orgány či jiné měkké tkáně atd.⁴⁾

V zásadě lze tvrdit, že právě ve vyšetřování mozku je MRI nepřekonatelnou technikou pro stanovení diagnózy. Vyšetření mozku magnetickou rezonancí s sebou nese hned několik výhod, na rozdíl od ostatních diagnostických technik, jež jsou v současné době k dispozici. Ve srovnání s vyšetřením mozku pomocí lumbální punkce se jedná o metodu neinvazivní, během níž není pacient vystaven nežádoucím účinkům rentgenového záření (jako v případě výpočetní tomografie, též označované jako počítačová tomografie, CT) ani účinkům

radioaktivního záření (jako tomu je u pozitronové emisní tomografie, PET či tomografické scintigrafie, SPECT). V případě MRI dochází k mnohem dokonalejšímu zobrazování měkkých mozkových tkání (díky detekci vodíkových atomů molekul vody), než v případě výpočetní tomografie, kdy v měkkých tkáních dochází pouze k nízké absorpci rentgenového záření a většina záření je absorbovaná lebeční kostí. Na druhou stranu kostní tkáň obsahuje jen malé množství vody, z tohoto důvodu jsou poruchy kostí obtížně detekovatelné pomocí MRI, zatímco počítačová tomografie je pro zobrazování kostních defektů vhodnější.

Existují specializované metody, pomocí kterých lze stanovit jen určitý typ mozkového onemocnění. Mezi tyto metody patří např. angiografie či sonografie, jež slouží výhradně ke sledování onemocnění mozkových tepen. Naproti tomu zobrazení magnetickou rezonancí je tak citlivé ke změnám ve stavbě mozku, že se tato metoda využívá nejen k diagnostice nádorů a cévních poruch, ale také ke stanovení dalších onemocnění, jako je např. epilepsie, poruchy paměti či roztroušená skleróza.⁵⁾

4.4.1. Výhody MRI

Pomocí neinvazivní zobrazovací techniky MRI lze sledovat živé systémy *in vivo*, aniž by došlo k jejich poškození vlivem ionizujícího záření. Další výhodou MRI je jeho vysoká rozlišovací schopnost, a to jak v prostoru, tak i v čase, která nám poskytuje zásadní informace o fyziologickém stavu jednotlivých tkání na anatomické úrovni. Pomocí této metody je možné zkoumat nejen vnitřní části lidského těla, ale za použití vhodných kontrastních látek také jednotlivé buněčné populace.[14]

4.4.2. Nevýhody MRI

Nevýhodou MRI je stálá přítomnost silného magnetického pole. Díky této vlastnosti se MRI stává metodou nedostupnou pro pacienty s kardiostimulátory a kovovými náhradami, které jsou vyrobeny z magnetických kovů. Další nevýhodou je omezený skenovací prostor přístroje, do něhož nemohou být umístěni pacienti trpící nadměrnou obezitou. Ze stejného důvodu je tato technika nevhodná také pro pacienty trpící klaustrofobií.⁴⁾

5. Neběžné magnetické nanočástice používané v MRI

Nanočástice lze definovat jako částice, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 nm do 100 nm, a to minimálně ve dvou rozměrech.[51] Magnetické nanočástice lze použít jako

MRI kontrastní látky; v závislosti na tom, zda ovlivňují více podélnou nebo příčnou relaxaci signálu vody, se dělí na pozitivní (T_1 , zvyšují signál) a negativní (T_2 , snižují signál) kontrastní látky.[52] Relaxivita určuje míru účinnosti kontrastní látky, vychází z relaxačních časů jaderných spinů protonů vody, ve kterých je kontrastní látka rozpuštěna. Čím vyšší je relaxivita, tím větší je účinnost magnetických nanočástic jako MRI kontrastních agens.[20]

5.1. Ferity se spinelovou strukturou MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn, Ni, Zn$)

Superparamagnetické nanočástice se spinelovou strukturou jsou MRI kontrastní látky obecného vzorce $A^{2+}B_2^{3+}O_4$, kde ionty A^{2+} v nejtěsnějším uspořádání oxidových iontů obsazují tetraedrické dutiny a ionty B^{3+} obsazují polohy oktaedrické. Takovéto obsazení se nazývá jako „normální spinel“. V případě, že kation kovu M^{2+} obsazuje polohy B a kation kovu M^{3+} obsazuje polohy A, pak se jedná o tzv. „inverzní spinel“. Mezi ferity s normální spinelovou strukturou patří z výše uvedených pouze $ZnFe_2O_4$. Ferit $MnFe_2O_4$ má smíšenou spinelovou strukturu, ve které kationty Mn^{2+} obsazují oba typy poloh (A i B). Ostatní kovové ferity (s obsahem Fe^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+}) mají inverzní spinelovou strukturu.[52] Obsazení jednotlivých krystalografických poloh je závislé na poloměru, elektronové struktuře a valenci příslušných kovových iontů.[20] Vnější magnetické pole působí na spiny atomů v polohách B, které se jeho vlivem řadí paralelně, zatímco spiny atomů v polohách A se řadí antiparalelně. Jelikož ve spinelové struktuře je dvakrát víc atomů v poloze B než v poloze A, vzájemné A-B interakce neumožňují kompenzaci magnetického momentu.[52] Superparamagnetické feritové nanočástice jsou účinnými kontrastními látkami právě díky jejich velkým magnetickým momentům (daným seřazením jednotlivých jaderných spinů účinkem vnějšího magnetického pole), jejichž prostřednictvím dochází ke zkracování T_2 relaxačního času v blízkosti se nacházejících vodíkových protonů, což má za následek nižší intenzitu signálu vedoucí k tmavšímu MR obrazu.

Ferity se spinelovou strukturou jsou v podstatě univerzální magnetické nanočástice, které našly uplatnění v celé řadě biologických aplikací, jako je např. MRI, hypertermie, biodetekce nebo podávání léků.[20]

5.1.1. $Fe^{2+}Fe_2^{3+}O_4$

Mezi nejběžnější nanočástice, které našly uplatnění v klinické praxi jako kontrastní látky, bezesporu patří superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO), jež se používají déle než dvacet let (poprvé byly představeny jako kontrastní agens v roce 1986 při studiu

jaterní tkáni).[53] Nanočástice oxidů železa jsou tvořeny kombinací maghemitu ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetitu (Fe_3O_4); jejich výsledné složení odpovídá inverzní spinelové struktuře.[54]

Jelikož je tato Bc. práce zaměřena na neběžné magnetické nanočástice (jiné než Fe_2O_3 a Fe_3O_4), nebude nadále SPIO nanočásticím věnována pozornost.

5.1.2. CoFe_2O_4

Lee et al. použili CoFe_2O_4 nanočástice jako MRI kontrastní agens pro značení myších mezenchymálních kmenových buněk (mMSCs) při studiu infarktu myokardu na myším modelu. Nanočástice byly připraveny srážecí metodou a následně byly obaleny silikagelem s přídavkem organického fluoroforu RITC (rhodamin B isothiokyanát). Povrch nanočástic byl dále modifikován polyethylenglykolem (PEG). Výsledná velikost nanočástic se pohybovala kolem 65 nm. K označení mMSCs (získaných z kostní dřeně sedmítýdenní myši) došlo přímou inkubací buněk s nanočásticemi. Takto označené buňky byly injektovány do infarktu myokardu myšího samce (infarkt byl vyvolán ligací koronární tepny). Následně byla sledována distribuce mMSCs uvnitř myokardu pomocí MRI.[55]

CoFe_2O_4 nanočástice obalené kyselinou listovou našly své uplatnění jako specifické transportéry protinádorových léčiv. Mohapatra et al. připravili na základě jednoduché metody (tepelným rozkladem $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a chloridu železitého v ethylenglykolu v přítomnosti octanu sodného a ethanolaminu) mezoporézní superparamagnetické nanonosiče na bázi CoFe_2O_4 s povrchovými funkčními aminoskupinami. Tyto částice byly posléze obaleny kyselinou listovou a na aminoskupiny byly připojeny RITC fluorescenční markery a vlastní protinádorová agens (methotrexate a doxorubicin). Celková velikost částic se pohybovala v rozmezí 35–40 nm. Částice tvořily ve vodě stabilní suspenzi, byly monodisperzní a vysoce stabilní v prostředí o fyziologickém pH, aniž by došlo ke změnám jejich hydrodynamické velikosti. Cytotoxicita takto připravených nanonosičů byla zkoumána na kultuře nádorové buněčné linie HeLa buněk.[56] Nádorové buňky jsou známé zvýšenou mírou exprese membránových folátových receptorů.[57] Nanočástice, nesoucí protinádorová léčiva, jsou prostřednictvím svého obalu z kyseliny listové specificky vychytávány těmito folátovými receptory, díky tomu mohou být léčiva dodána přímo do nádorových buněk. Při studiu léčby nádorových onemocnění na základě transportu protinádorových léčiv prostřednictvím CoFe_2O_4 byla prokázána zvýšená cytotoxicita léčiv vedoucí k apoptóze nádorových HeLa buněk.[56]

CoFe_2O_4 nanočástice mohou být použity i při léčbě nádorů pomocí magnetické hypertermie, která vychází z aplikace střídavého magnetického pole produkovaného cívkou.

Poté co je vzorek (např. vialka s buňkami označenými pomocí nanočástic) vložen do cívky, střídavé magnetické pole způsobí zahřátí magnetických nanočástic (nanočástice slouží jako zdroj tepla). Tato metoda je výhodná při léčbě malých nádorů vyskytujících se na velké ploše, jako např. v případě rakoviny jater.[58,59]

5.1.3. MnFe₂O₄

Paramagnetické Mn²⁺ ionty sehrály v historii MRI důležitou roli. Byly totiž navrženy jako vůbec první kontrastní látky pro tuto zobrazovací techniku (viz kap. 4.1. Historie MRI).

Je známo, že se Mn²⁺ ionty uplatňují jako kofaktory v biologických systémech, kde hrají důležitou roli např. při transportu elektronů, detoxikaci volných radikálů či syntéze neurotransmiterů. Přesto jejich použití v podobě kontrastních látek pro MRI nese jistá omezení vyplývající z jejich cytotoxicity.[44]

Yang et al. popsali postup výroby superparamagnetických MnFe₂O₄ nanočástic pro MRI, založený na tepelném rozkladu. Za obalový materiál byl zvolen tetraethylenglykol zajišťující stabilitu suspenze nanočástic ve vodném roztoku. Výsledné nanočástice měly v průměru ~ 7 nm. Bylo zjištěno, že MnFe₂O₄ nanočástice mohou sloužit jako citlivé MR kontrastní agens, jež se po intravenózní injekci přednostně akumulují v játrech po dobu až čtyř hodin. Změnou obalového materiálu je možné připravit MnFe₂O₄ MRI kontrastní látky pro zobrazování jiných typů tkání.[53]

Lu et al. použili pro MR značení myší jaterní tkáně MnFe₂O₄ nanočástice připravené v organické fázi. Povrch nanočástic byl posléze obalen mPEG-PCL (methoxy poly(etylen glykol)-b-poly(ε-caprolactonem)). Tyto nanočástice mají tendenci vytvářet klastry uvnitř mPEG-PCL micel o velikosti 80±30 nm.[60]

Podobně, jako v případě CoFe₂O₄, mohou být i MnFe₂O₄ nanočástice použity při léčbě nádorových onemocnění pomocí magnetické hypertermie. Bradhana et al. připravili fluidní MnFe₂O₄ nanočástice obalené laurovou (dodekanovou) kyselinou o velikosti v rozmezí 9 – 11 nm. *In vitro* testy viability byly provedeny na buněčné linii BHK-21 (linie ledvinových buněk z mladých křečků druhu *Mesocricetus auratus*).[61]

5.1.4. NiFe₂O₄

Chen et al. připravili NiFe₂O₄ nanočástice tzv. sol-gel metodou, která využívá polyakrylovou kyselinu (PAA) jako chelatační činidlo. PAA také přispívá ke zvýšení

krystalinity nanočástic. Touto metodou byly připraveny čisté nanočástice s průměrem 5–30 nm, které vykazovaly superparamagnetické vlastnosti.[62]

Kale et al. připravili NiFe_2O_4 nanočástice reverzní micelovou technikou. Výsledné krystalické nanočástice byly velké 5–8 nm. Magnetické vlastnosti nanočástic připravených touto metodou jsou závislé na jejich průměru.[63]

NiFe_2O_4 nanočástice připravené výše uvedenými postupy mají magnetické vlastnosti, a tudíž jsou potenciálními kandidáty pro použití v MRI. Nicméně na těchto nanočásticích nebyly provedeny základní *in vitro* a *in vivo* pokusy.

5.1.5. ZnFe_2O_4

ZnFe_2O_4 má, na rozdíl od výše uvedených spinelů MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$), normální spinelovou strukturu, kde Zn^{2+} ionty přednostně obsazují polohy A. Díky tomuto uspořádání má spinel ZnFe_2O_4 antiferomagnetické vlastnosti, a tudíž je nevhodný pro použití v MRI zobrazování. Ovšem po přidání ZnFe_2O_4 do inverzní spinelové struktury (např. do Fe_3O_4) dochází u výsledného smíšeného spinelu k významnému zvýšení čistého magnetického momentu. Směsné spinelové nanočástice Zn-SPIO neboli $\text{Zn}_x\text{Fe}_{1-x}\text{O} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (až do $x = 0.34$) vykazují oproti běžně používaným SPIO nanočásticím zvýšenou T_2 relaxivitu, a ve srovnání s Mn-ferity jsou Zn-SPIO nanočástice mnohem méně toxické.[52]

5.1.6. Zhodnocení relaxivity vybraných spinelových fází

Kim et al. pozorovali lineární korelaci relaxivity v závislosti na magnetické susceptibilitě materiálu (viz Tab. 2). U vybraných spinelových fází (nejvíce používaných v biologických aplikacích) byly pozorovány vysoké hodnoty T_2 relaxivit; vůbec nejvyšší hodnota relaxivity byla naměřena u CoFe_2O_4 . [64]

Tab. 2: Závislost příčné relaxivity na hodnotách susceptibility; experimentální podmínky: $B = 9,4$ T; Tab. 2 převzata a upravena z [64]

Příslušný ferit	Průměrná velikost (nm)	R_2 ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Fe_3O_4	$6,0 \pm 0,7$	256
CoFe_2O_4	$8,0 \pm 1,0$	393
MnFe_2O_4	$7,6 \pm 1,4$	228

5.2. Perovskitové manganity

Perovskitové manganity neboli LSMO jsou magnetické nanočástice o složení $\text{La}_{1-x}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ ($x = 0,25$ v případě, že jsou částice obaleny dvojitou vrstvou siliky).[65]

Magnetické vlastnosti těchto nanočástic závisí na parametru x a na velikosti částic.[66] Částice mohou být připraveny metodou sol-gel využívají kyselinu citronovou a ethylenglykol. Poté následuje mechanické zpracování potřebné pro separaci jednotlivých částic. Povrch nanočástic lze obalit pomocí PVP (polyvinylpyrrolidonu) a následně ještě pomocí silikagelu, která zajistí koloidní stabilitu částic, jejich vysokou magnetizaci a nízkou toxicitu. Testy viability je možné provést např. na různých buněčných liniích (HeLa buňky, mezenchymální kmenové buňky potkanů (rMSCs) a lidské fibroblasty), výsledná cytotoxicita se liší v závislosti na typu použité buněčné linii. Zkrácení T_2 relaxačního času je možné ověřit pomocí MRI.[65]

5.4. Oxidy lanthanoidů Ln_2O_3 ($\text{Ln} = \text{Nd}, \text{Gd}, \text{Dy}, \text{Er}, \text{Yb}$)

Nanočástice oxidů lanthanoidů mají vysokou hustotu Ln^{3+} iontů, a díky jejich magnetickým vlastnostem jsou vhodnými kandidáty pro MRI. Před vlastním použitím těchto nanočástic jako kontrastních látek, je potřeba obalit jejich povrch příslušnou biokompatibilní látkou, např. dextranem nebo polysiloxanem. Nanočástice Ln_2O_3 jsou v čisté vodě stabilní po dobu několik dní, avšak v přítomnosti silného magnetického pole (silnějšího než 7 T) dochází k jejich nežádoucímu srážení. Tomu se dá předejít přidáním xanthanové gumy do vody. Připojením některých funkčních skupin (jako je např. funkční skupina PEGu) mohou být vylepšeny určité vlastnosti nanočástic, jako např. jejich biodistribuce. Nanočástice Ln_2O_3 mohou po vazbě na vhodný vektor sloužit také k doručování léčiv.

Ln_2O_3 nanočástice nemají téměř žádný vliv na longitudinální relaxační čas T_1 (s výjimkou Gd_2O_3) vodíkových atomů molekul vody, avšak mají výrazný vliv na transverzální relaxační čas T_2 . Ze všech oxidů lanthanoidů dosahuje největší hodnoty příčné relaxivity oxid dysprositý Dy_2O_3 (viz Tab. 3).[67]

Na rozdíl od ostatních oxidů lanthanoidů lze Gd_2O_3 nanočástice použít také jako pozitivní T_1 kontrastní látky zvyšující intenzitu MRI signálu. Jádra těchto nanočástic mohou být obalena pomocí diethylenglykolu. Ve srovnání s T_1 kontrastními látkami běžně používanými v klinické praxi, které jsou založeny na gadolinitých komplexech (jako je např. Gd-DTPA), vykazují nanočástice Gd_2O_3 mnohem větší hodnoty relaxivity při stejných koncentracích kontrastního agens.[68]

Tab. 3: Vybrané parametry (průměrná velikost částic r_p a relaxivita R_2) **změřené na vodných suspenzích oxidů lanthanoidů**; experimentální podmínky: $B = 7 \text{ T}$; $t = 25 \text{ °C}$;

Tab. 3 převzata a upravena z [67]

Oxid lanthanoidu	Průměrná velikost (nm)	R_2 ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Nd_2O_3	123 ± 12	32 ± 3
Gd_2O_3	65 ± 6	237 ± 24
Dy_2O_3	50 ± 5	300 ± 33
Er_2O_3	49 ± 5	238 ± 25
Yb_2O_3	74 ± 7	68 ± 6

5.4. Fluoridy lanthanoidů LnF_3

Cheung et al. představili LnF_3 nanočásticové agregáty tvořené směsí GdF_3 a CeF_3 , jejichž jádra jsou pokrytá lineární řetězci polyakrylové kyseliny (PAA_{25}). Velikost těchto nanočástic závisí na poměru iontů Gd^{3+} a Ce^{3+} . Nanočástice o ideální struktuře by měly sestávat z malých částic s co největším povrchem pro kontakt s molekulami vody. Velikost a morfologie nanočástic ovlivňuje jejich stabilitu, biodistribuci, opsonizaci, metabolismus a cytotoxicitu. Podobně jako Gd_2O_3 i GdF_3 významně zkracuje T_1 relaxační čas, a poskytuje mnohem intenzivnější signál, než běžně používané gadolinité cheláty o stejné koncentraci.[57]

6. Závěr

Buňky mohou pomocí endocytózy přijímat z extracelulárního prostředí kromě živin také celou řadu dalších látek, včetně nanočástic. Na procesu prosté endocytózy je založeno nejjednodušší značení buněk, které spočívá v přímé inkubaci kontrastního agens s buněčnou kulturou. Během proliferace buněk dochází k postupnému rozředění přijaté kontrastní látky. Tomuto jevu lze předejít použitím složitějších metod buněčného značení vycházejících z genového inženýrství. Tato metoda je vhodná při značení buněk pomocí fluorescenčních značek, ale přesto nelze použít pro MRI, které jako kontrastní agens využívá sloučeniny přechodných kovů lanthanoidů. Účinnost buněčné značení lze výrazně zvýšit také pomocí tzv. specifického značení buněk, jež spočívá v konjugaci kontrastního agens s příslušným vektorem (např. protilátkou). Tento typ značení navíc umožňuje cílené značení konkrétních buněk uvnitř buněčné populace. V závislosti na typu kontrastního agens lze následně označené buňky sledovat a dále analyzovat pomocí nejrůznějších zobrazovacích metod, ať už se jedná např. o světelnou či fluorescenční mikroskopii, průtokovou cytometrii nebo magnetickou rezonanci.

Magnetická rezonance (MRI) představuje v mnoha ohledech nepřekonatelnou diagnostickou technikou umožňující trojrozměrné zobrazování měkkých tkání na základě detekce vodíkových protonů molekul vody obsažených v tkáních. Výsledný MR kontrast může být ovlivněn přidávkem vhodného kontrastního agens, které způsobí významné zkrácení relaxačního času T_1 (vedoucího k jasnějšímu obrazu) nebo relaxačního času T_2 (vedoucího k tmavšímu obrazu). Podle toho, který z relaxačních časů je ovlivněn více, je možné kontrastní látky rozdělit na tzv. pozitivní (T_1) a negativní (T_2).

Jedněmi z nejdéle používaných kontrastních agens v MR zobrazování jsou SPIO nanočástice. Kromě těchto běžně používaných nanočástic na bázi oxidů železa (magnetit – Fe_3O_4 a maghemit – $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) existuje celá řada dalších magnetických nanočástic, které mohou být použity v MRI; jedná se zejména o smíšené ferity mající spinelovou strukturu (analogické k SPIO částicím), perovskitové nanočástice, oxidy lanthanoidů (zvláště Dy_2O_3 a Gd_2O_3) a fluoridy lanthanoidů.

7. Seznam použité literatury

- [1] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Controlled Release*, **2010**, 145, 182-195.
- [2] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature*, **2003**, 422, 37-44
- [3] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2009**, 66, 2873-2896
- [4] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annu. Rev. Immunol.*, **1999**, 17, 593-623
- [5] D. E. Owens, N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.*, **2006**, 307, 93-102
- [6] E. Groves, A. Dart, V. Covarelli, E. Caron, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65, 1957-1976
- [7] F. M. Brodsky, C.-Y. Chen, C. Kneuhl, M. C. Towler, D. E. Wakeham, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2001**, 17, 517-568
- [8] L. M. Bareford, P. W. Swaan, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2007**, 59, 748-758
- [9] R. G. Parton, K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, 8, 185-194
- [10] J. Mercer, A. Helenius, *Nat. Cell Biol.*, **2009**, 11, 510-520
- [11] M. C. Kerr, R. D. Teasdale, *Traffic*, **2009**, 10, 364-371
- [12] G. J. Doherty, H. T. McMahon, *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 857-902
- [13] Y. Lu, P. S. Low, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2002**, 54, 675-693
- [14] M. R. Bernsen, A. D. Moelker, P. A. Wielopolski, S. T. van Tiel, G. P. Krestin, *Eur. Radiol.*, **2010**, 20, 255-274
- [15] D. L. Kraitchman, J. W. M. Bulte, *Basic. Res. Cardiol.*, **2008**, 103, 105-113
- [16] D. L. Kraitchman, J. W. M. Bulte, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2009**, 29, 1025-1030
- [17] A. Bhirde, J. Xie, M. Swierczewska, X. Chen, *Nanoscale*, **2011**, 3, 142-153
- [18] M. L. Thakur, A. W. Segal, L. Louis, M. J. Welch, J. Hopkins, T. J. Peters, *J. Nucl. Med.*, **1977**, 18, 1022-1026
- [19] R. Wissleder, H.-C. Cheng, A. Bogdanova, A. Bogdanov, *J. Magn. Reson. Imaging*, **1997**, 7, 258-263
- [20] E. A. Schultz-Sikma, H. M. Joshi, Q. Ma, K. W. MacRenaris, A. L. Eckermann, V. P. Dravid, T. J. Meade, *Chem. Mater.*, **2011**, 23, 2657-2664
- [21] P. Walczak, D. A. Kedziorek, A. A. Gilad, B. P. Barnett, J. V. M. Bulte, *Magn. Reson. Med.*, **2007**, 58, 261-269
- [22] C. Seydel, *Science*, **2003**, 300, 80-81
- [23] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.*, **2005**, 4, 435-446
- [24] J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7, 626-634

- [25] L. Vozza-Brown, J. Fan, S. Vasu, X. Yu, B. Wang, U. Lakshmiopathy, J. Macemon, H. Chiou, K. Frimpong, Lipofectamine™ LTX: A New Transfection Reagent for Effective Transfection of Primary Cells, Hard-to-Transfect Cells and Sensitive Established Cell Lines
http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/other/benchttopics/Issue-0410.Par.33944.File.dat/an2419.pdf (aktuální ke dni 12. 8. 2011)
- [26] V. Ponomarev, *J. Nucl. Med.*, **2009**, 50, 1013-1016
- [27] P. Walczak, D. A. Kedziorek, A. A. Gilad, S. Lin, J. W. M. Bulte, *Magn. Reson. Med.*, **2005**, 54, 769-774
- [28] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *The EMBO Journal*, **1982**, 1, 841-845
- [29] N. Odani, K. Ito, H. Nakamura, *Dev. Growth Differ.*, **2008**, 50, 443-448
- [30] E. Terreno, S. G. Crich, S. Belfiore, L. Biancone, C. Cabella, G. Esposito, A. D. Manazza, S. Aime, *Magn. Reson. Med.*, **2006**, 55, 491-497
- [31] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small*, **2008**, 4, 26-49
- [32] T. Mitrelias, J. Palfreyman, Z. Jiang, J. Llandro, J. A. C. Bland, R. M. Sanchez-Martin, M. Bradley, *J. Magn. and Magn. Mater.*, **2007**, 310, 2862-2864
- [33] K. Licha, C. Olbrich, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, 57, 1087-1108
- [34] J. V. Frangioni, R. J. Hajjar, *Circulation*, **2004**, 110, 3378-3383
- [35] E. J. Sutton, T. D. Henning, B. J. Pichler, C. Bremer, H. E. Daldrup-Link, *Eur. Radiol.*, **2008**, 18, 2021-2032
- [36] P. R. Contag, *Drug Discovery Today*, **2002**, 7, 555-562
- [37] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods*, **2005**, 2, 932-940
- [38] A. Diaspro, M. Robello, *J. Photochem. Photobiol.*, **2000**, 55, 1-8
- [39] F. Zhang, J. Xie, G. Liu, Y. He, G. Lu, X. Chen, *Mol. Imaging Biol.*, **2011**, 13, 695-701
- [40] J. C. Richardson, R. W. Bowtell, K. Mäder, C. D. Melia, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, 57, 1191-1209
- [41] A. Traboulsee, *J. Neurol.*, **2004**, 251, 36-41
- [42] M. A. Hahn, A. K. Singh, P. Sharma, S. C. Brown, B. M. Moudgil, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399, 3-27
- [43] J. Pekar, *IEEE Eng. Med. Biol. Magazine*, **2006**, 25, 24-26
- [44] A. P. Koretsky, A. C. Silva, *NMR Biomed.*, **2004**, 17, 527-531
- [45] P. C. Lauterbur, *Nature*, **1973**, 242, 190-191
- [46] B. Bytes, *Acta Neuropsychiatrica*, **2010**, 22, 90-92

- [47] A. G. Filler, History, Development and Impact of Computed Imaging in Neurological Diagnosis and Neurosurgery: CT, MRI & DTI, **2009**
- [48] H. B. Na, In. C. Song, T. Hyeon, *Adv. Mater.*, **2009**, 21, 2133-2148
- [49] A. Brown, R. C. Semelka, MRI: Basic Principles and Applications, Wiley-Liss, New York 2003
http://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=oYOIH3YkuMC&oi=fnd&pg=PR9&dq=MRI:basic+principles+and+applications&ots=ZIFhEuLjBW&sig=_n-GoHo_1jGGbWPYCP1L6pNC6LY#v=onepage&q&f=false (aktuální ke dni 2. 8. 2011)
- [50] U. I. Tromsdorf, N. C. Bigall, M. G. Kaul, O. T. Bruns, M. S. Nikolic, B. Mollowitz, R. A. Sperling, R. Reimer, H. Hohenberg, W. J. Parak, S. Förster, U. Beisiegel, G. Adam, H. Weller, *Nano Lett.*, **2007**, 7, 2422-2427
- [51] ASTM E 2456-06 Terminology for Nanotechnology, *ASTM International*, **2006**
- [52] C. Bárcena, A. K. Sra, G. S. Chaubey, C. Khemtong, J. P. Liu, J. Gao, *Chem. Commun.*, **2008**, 2224-2226
- [53] H. Yang, C. Zhang, X. Shi, H. Hu, X. Du, Y. Fang, Y. Ma, H. Wu, S. Yang, *Biomaterials*, **2010**, 31, 3667-3673
- [54] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, M. Port, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2006**, 1471-1504
- [55] K. Lee, C. Park, H. - Y. Moon, E. Ahn, H. E. Park, S. - H. Ihm, K. - B. Seung, T. - J. Yoon, K. Chang, C. Lee, C. Cheong, K. S. Hong, *Current Applied Physics*, **2009**, 9, 512–514
- [56] S. Mohapatra, S. R. Rout, S. Maiti, T. K. Maiti, A. B. Panda, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 9185-9193
- [57] E. N. M. Cheung, R. D. A. Alvares, W. Oakden, R. Chaudhary, M. L. Hill, J. Pichaandi, G. C. H. Mo, Ch. Yip, P. M. Macdonald, G. J. Stanis, F. C. J. M. van Veggel, R. S. Prosser, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 4728-4739
- [58] E. Kita, T. Oda, T. Kayano, S. Sato, M. Minagawa, H. Yanagihara, M. Kishimoto, C. Mitsumata, S. Hashimoto, K. Yamada, N. Ohkohchi, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2010**, 43, 1-9
- [59] J.-P. Fortin, F. Gazeau, C. Wilhelm, *Eur. Biophys. J.*, **2008**, 37, 233-228
- [60] J. Lu, S. Ma, J. Sun, C. Xia, C. Liu, Z. Wang, X. Zhao, F. Gao, Q. Gong, B. Song, X. Shuai, H. Ai, Z. Gu, *Biomaterials*, **2009**, 30, 2919-2928
- [61] P. Pradhan, J. Giri, G. Samanta, H. D. Sarma, K. P. Mishra, J. Bellare, R. Banerjee, D. Bahadur, *J. Biomed. Mater. Res. B: Applied Biomaterials*, **2007**, 81B, 12-22
- [62] D. – H. Chen, X. – R. He, *Mater. Res. Bull.*, **2001**, 36, 1369-1377

- [63] A. Kale, S. Gubbala, R. D. K. Misra, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2004**, 277, 350-358
- [64] D.-H. Kim, H. Zeng, Thian C. Ng, C. S. Brazel, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2009**, 321, 3899-3904
- [65] M. Kačenka, O. Kamman, J. Kotek, L. Falteisek, J. Černý, D. Jiráček, V. Herynek, K. Zacharovová, Z. Berková, P. Jendelová, J. Kupčík, E. Pollert, P. Veverka, I. Lukeš, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 157-164
- [66] E. Pollert, K. Knižek, M. Maryško, P. Kašpar, S. Vasseur, E. Duguet, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, 316, 122–125
- [67] M. Norek, G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldies, A. Denkova, W. Zhou, J. A. Peters, *J. Phys. Chem.*, **2007**, 111, 10240 -10246
- [68] M. Engström, A. Klasson, H. Pedersen, C. Vahlberg, P. - O. Käll, K. Uvdal, *Magn. Reson. Mater. Phy.*, **2006**, 19, 180-186

Internetové stránky – aktuální ke dni 2. 8. 2011

- 1) <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/McDonald/Genes/un.html>
- 2) http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html
- 3) http://www.fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=13
- 4) <http://www.anapolschwartz.com/practices/gadolinium-nsf/blog/mri-side-effects.html>
- 5) <http://www.poranenimozku.cz/zajimavosti-vyzkum/odborne-clanky/metody-vysetreni-mozku.html>