

# MR BUNĚČNÉ ZOBRAZOVÁNÍ

## MOLECULAR IMAGING BY MAGNETIC RESONANCE

### přehledový článek

**Daniel Jiráček**

MR oddělení, Pracoviště  
radiodiagnostiky a intervenční  
radiologie, Institut klinické  
a experimentální medicíny, Praha

Přijato: 15. 11. 2017.

#### Korespondenční adresa:

doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.  
MR oddělení ZRIR  
IKEM  
Václavská 1958/9, 140 21 Praha 4  
e-mail: daniel.jiracek@medicon.cz

Konflikt zájmů: žádný.

Podpořeno z programového pro-  
jektu Ministerstva zdravotnictví ČR  
s reg. č. 15-25781A a MZ ČR – RVO  
 („Institut klinické a experimentální  
 medicíny – IKEM, IČ 00023001“) a  
 GAČR P205-16-03156S. Veškerá  
 práva podle předpisů na ochranu  
 duševního vlastnictví jsou vyhra-  
 zena.

#### Hlavní stanovisko práce

Článek shrnuje možnosti zobrazování magnetickou  
 rezonancí na buněčné a molekulární úrovni  
 a ukazuje příklady studií z experimentální i  
 klinické medicíny provedených v Institutu klinické  
 a experimentální medicíny.

### SOUHRN

#### Jiráček D. MR buněčné zobrazování

V článku se popisuje historie buněčného  
 zobrazování pomocí magnetické rezonan-  
 ce v České republice, naše zkušenosti v této  
 oblasti získané na pracovišti MR v Institutu  
 klinické a experimentální medicíny a nej-  
 novější trendy v této oblasti, včetně použití  
 multimodálních kontrastních látek. V člán-  
 ku jsou uvedené i aplikace z experimentální  
 medicíny na různých zvířecích modelech  
 a příklad klinické studie, kde se využívaly  
 kontrastní látky ke značení transplantova-  
 ných pankreatických ostrůvků.

**Klíčová slova:** kontrastní látka, buněčné  
 značení, molekulární zobrazování, zvířecí  
 modely, klinická studie.

#### Major statement

The paper summarizes possible usage of molecular  
 and cellular imaging by magnetic resonance and  
 shows examples from experimental and clinical  
 studies performed in the Institute for Clinical and  
 Experimental Medicine.

### SUMMARY

#### Jiráček D. Molecular imaging by magnetic resonance

We describe the history of molecular/cellu-  
 lar imaging using magnetic resonance ima-  
 ging in the Czech Republic, our experience  
 gained at the Department of Magnetic Re-  
 sonance at the Institute for Clinical and Ex-  
 perimental Medicine and the latest trends in  
 this field, including the use of multimodal  
 contrast agents. The article also contains ap-  
 plications from experimental medicine on  
 various animal models and an example of  
 a clinical study using contrast agents to label  
 transplanted pancreatic islets.

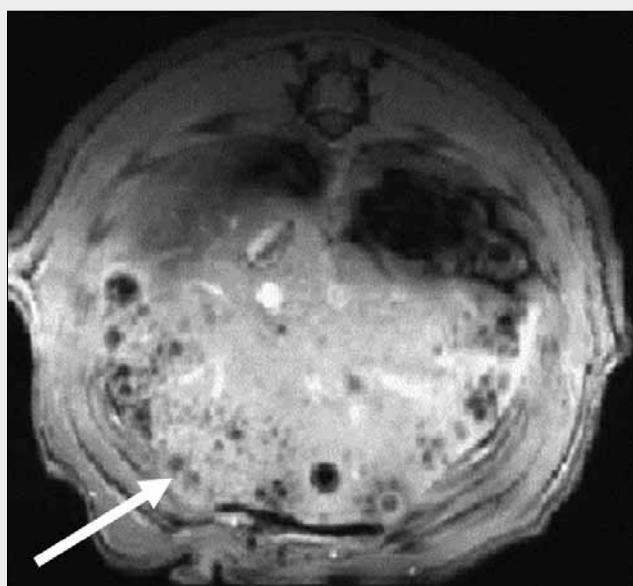
**Key words:** contrast agent, cell labeling,  
 molecular imaging, animal models, clinical  
 trial.

## ÚVOD

Lékařská diagnostika směřuje stále více od čistě anatomické-  
 ho zobrazování k získávání informací o biochemickém stavu  
 určité tkáně až na molekulární úrovni. Moderní diagnostické  
 zobrazovací metody jsou neinvazivní a jsou založeny na různých  
 fyzikálně-chemických principech. Mezi ně patří i magnetická  
 rezonance (MR). Velkou výhodou MR je, že může poskytovat  
 nejenom morfologickou informaci, ale i data o funkčním sta-  
 vu organismu. Pokud získáváme informace o stavu organismu  
 nebo určité tkáně na buněčné nebo molekulární úrovni, užívá  
 se v současné době pro tato zobrazování název *buněčné* nebo

*molekulární zobrazování (molecular imaging)*. Pojem mole-  
 kulární zobrazování se používá nejen v medicíně a preklinic-  
 kém výzkumu, ale i v molekulární biologii.

Jednou z neoptimálnějších metod pro buněčné zobrazo-  
 vání *in vivo* je zobrazování magnetickou rezonancí (MR). MR  
 není nejcitlivější metodou v porovnání s radionukleárními  
 metodami nebo optickým zobrazováním. Její velkou přednos-  
 tí je ale použití neionizujícího záření a relativně velké rozliše-  
 ní v libovolné rovině. Na rozdíl od radionukleárních metod  
 (pozitronová emisní tomografie – PET, jednofotonová emisní



▲ Obr. 1

Obr. 1. **T2\*-vážený MR obraz jater potkana s 2500 transplantovanými pankreatickými ostrůvky.** Pankreatické ostrůvky před vlastní transplantací značené T2 kontrastní látkou Resovist® jsou na MR obraze detekovatelné jako hypointenzní plochy (šipka). In vivo měření bylo provedeno týden po transplantaci pankreatických ostrůvků do jater (převzato z publikace Jiráček D, et al. MRI of transplanted pancreatic islets. Magn Reson Med 2004; 52(6): 1228–1233 (3)).

Fig. 1. **T2\*-weighted MR images of rat liver with 2500 transplanted pancreatic islets.** MRI in vivo was performed 1 week after transplantation of T2 contrast agent Resovist® labeled pancreatic islets. Arrow shows transplanted islets represented as a hypointense area in the liver tissue (from Jiráček D, et al. MRI of transplanted pancreatic islets. Magn Reson Med 2004; 52(6): 1228–1233 (3)).

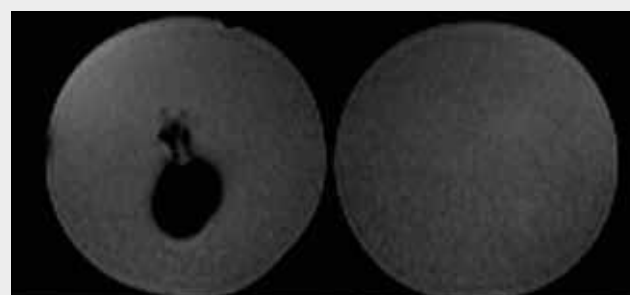
výpočetní tomografie – SPECT) poskytuje MR obrazy i bez aplikace kontrastní látky, jejich užití však podstatně zlepšuje kontrast mezi určitými tkáněmi a/nebo patologií. Senzitivita metody zobrazování MR není většinou i přes vysoké rozlišení obrazu dostatečná pro jednoznačné detekování transplantovaných nebo implantovaných nativních buněk právě z důvodu, že nativní (tj. neznačené) buňky mají podobné relaxační časy, jako má okolní prostředí. Jednoduchým řešením pro zlepšení detekce buněk může být použití kontrastních látek. Důležitými faktory pro vizualizaci a následnou detekci kontrastní látkou označených transplantovaných buněk jsou:

- dostatečné množství kontrastní látky, která je vázaná na receptory buněk nebo je přímo internalizovaná v buňkách
- stabilita kontrastní látky
- pevnost vazby kontrastní látky na buňku/v buňce

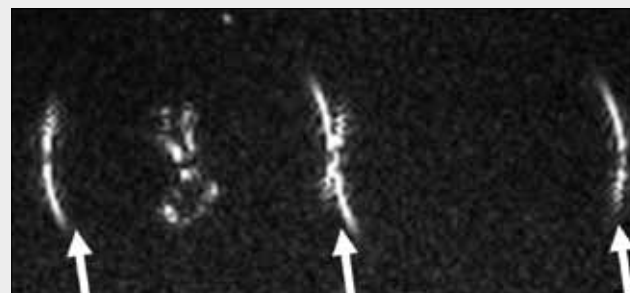
Z hlediska lékařských aplikací je důležité, aby použitá kontrastní látka nebyla vůči buňce toxická a neovlivňovala její funkci. V případě buněčného zobrazování rozeznáváme dva základní typy kontrastních látek: *T1 a T2 kontrastní látky, a to podle toho, zda ovlivňují více T1 nebo T2 relaxační časy.*

## POUŽITÍ T2 KONTRASTNÍCH LÁTEK

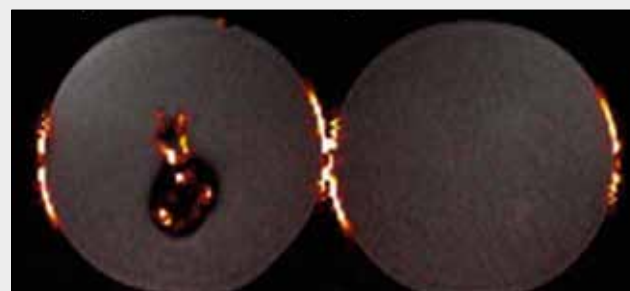
První výstupy týkající se buněčného zobrazování v rámci Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM), po-



▲ Obr. 2A



▲ Obr. 2B

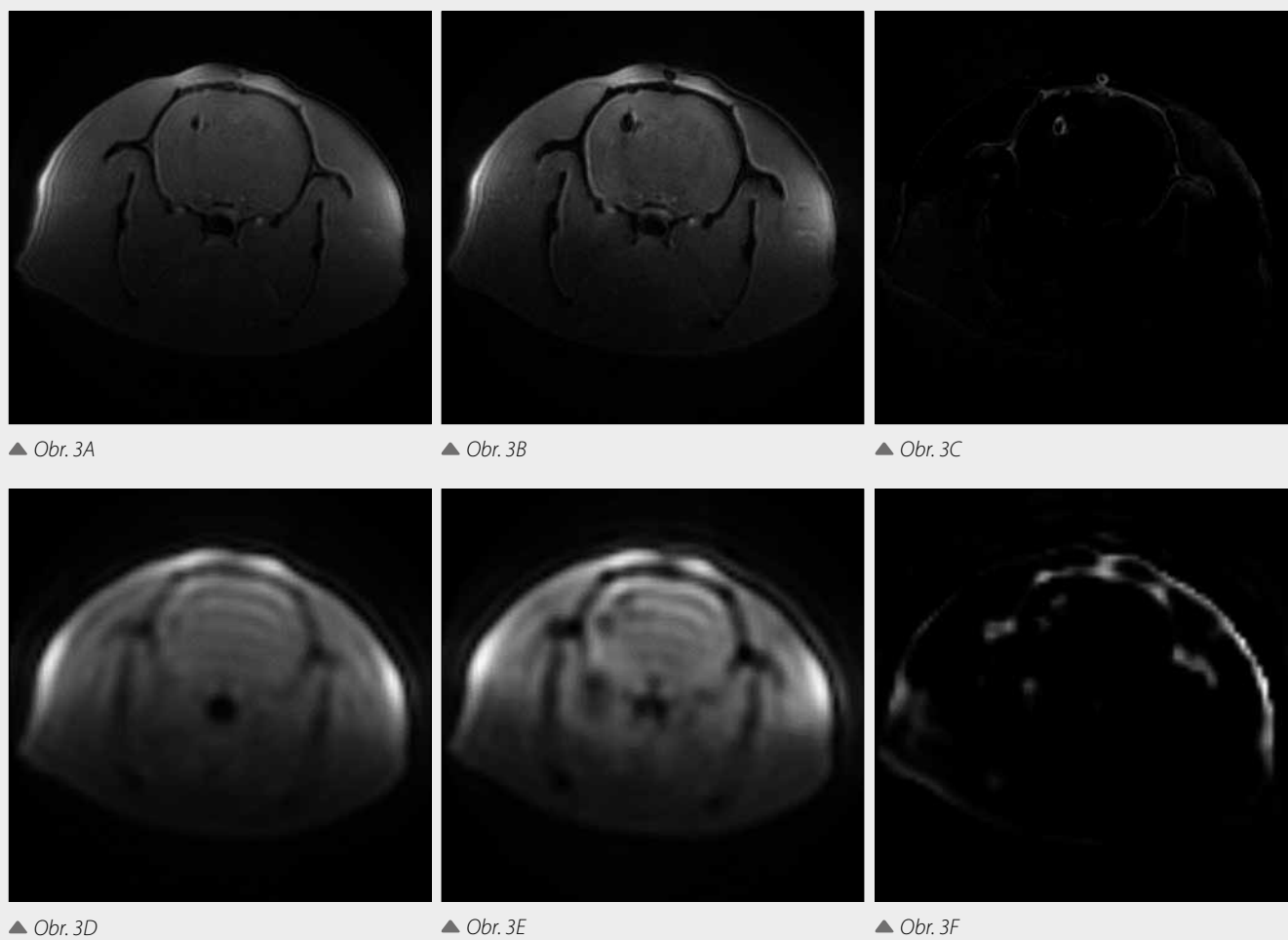


▲ Obr. 2C

Obr. 2. **Vizualizace suspenze pankreatických ostrůvků White marker technikou v želatinovém fantomu.** Vlevo je zobrazen fantom se SPIO značenými ostrůvky, vpravo je kontrolní fantom bez SPIO nanočástic. A – zobrazení pankreatických ostrůvků značených SPIO nanočásticemi T2-váženým MR obrazem; B – off-rezonanční obraz získaný White marker technikou. V tomto případě byla použita Echo-dephased Steady State Free Precession (SSFP) sekvence. Tato technika je citlivá na výrazné susceptibilní nehomogenity, což může být i rozhraní fantomu a vzduchu. Tím mohou vznikat obrazové artefakty (šipky), v případě použití sekvence Echo-dephased SSFP ve směru frekvenčního kódování. C – přeložený klasický (A) a off rezonanční (B) MR obraz

Fig. 2. **Visualisation of the pancreatic islets suspension in a gel phantom (control phantom on the right) using White marker technique – echo-dephased SSFP sequences.** The upper panel shows the selective consecutive frames (cropped) of a 3D dataset obtained using the echo-dephased SSFP sequence and essentially using the same parameters as that of bSSFP. The lower panel shows the selective consecutive frames (cropped) of a 3D dataset obtained using the bSSFP sequences. The hypointense regions in phantom depicting localisation of the pancreatic islets. Distributed hyperintensities (see white arrows) are clearly visible in the edges of the phantom because of unwanted gradient compensation in that region.

tažmo v České republice, byly v letech 2003–2004, kdy se publikovaly články týkající se zobrazení transplantovaných kmenových buněk nebo pankreatických ostrůvků značených nespecifickými T2 kontrastními látkami založenými na superparamagnetických nanočásticích oxidů železa (SPIO – Superparamagnetic Iron Oxide nanoparticles) (1–3). V případě pankreatických ostrůvků se jednalo celosvětově o jejich první zobrazení *in vivo* (obr. 1).



Obr. 3. **In vivo** zobrazení transplantovaných lidských mesenchymálních kmenových buněk do mozku postapoptikána pomocí UTE sekvenční. A, D – TE = 18  $\mu$ s; B, E – TE = 1 ms; C, F – rozdílový obraz. MR obrazy byly naměřeny s rozlišením  $0,2 \times 0,2 \times 0,4$  mm<sup>3</sup> (A, B) a s rozlišením  $0,5 \times 0,5 \times 2,0$  mm<sup>3</sup> (D, E) Fig. 3. **Visualization of the transplanted SPIO labeled human mesenchymal stem cells in the rat brain in vivo using UTE sequence.** A, D – TE = 18  $\mu$ s; B, E – TE = 1 ms; C, F – difference image). Images A, B and D, E were acquired with resolution  $0,2 \times 0,2 \times 0,4$  mm<sup>3</sup>, respectively  $0,5 \times 0,5 \times 2,0$  mm<sup>3</sup>. Arrow show the positive contrast generated by SPIO labeled cells.

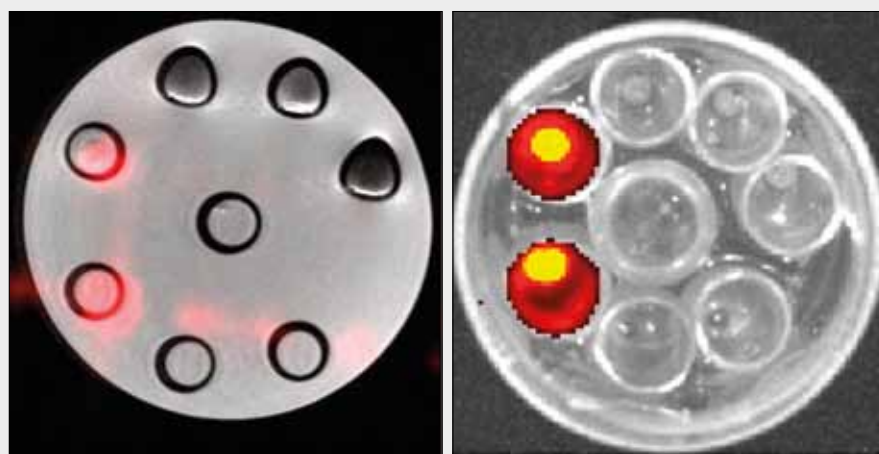
Efekt SPIO nanočástic je tak velký, že není problém detekovat SPIO značenou buňku jako hypointenzní signál, protože množství železa v buňce je většinou dostatečné pro MR detekci. Problémem je heterogenní nebo hypointenzní signál pozadí (plus obrazové artefakty, krvácení atd. dávající hypointenzní signál). Jedním z možných řešení jak zpřesnit detekci buněk je použití tzv. White markers (WM) techniky (4–8). Tyto techniky produkují pozitivní kontrast v off-rezonančním okolí železných nanočástic a naopak okolní signál potlačují. Toho využíváme pro generování pozitivního kontrastu SPIO nanočástic v MR obraze. Na obrázcích 2 a 3 je uveden příklad vizualizace SPIO značených pankreatických ostrůvků a kmenových buněk.

Odlišným způsobem zobrazení SPIO značených buněk pozitivním signálem je výrazné zkrácení echo času TE. Toho využívají sekvenční Zero echo time (ZTE) s nulovým TE a ultra-short echo time (UTE) s extrémně krátkým TE, řádově se jedná o mikrosekundy (9–11). Principem je naměření obrazů s dlouhým a krátkým echo časem a jejich odečtením od sebe. Rozdílový výsledný obraz zobrazí SPIO nanočástice jako hy-

perintenzní signál. Na obrázku 3 je uveden příklad zobrazení transplantovaných kmenových buněk do mozku potkana pomocí UTE sekvenční.

## POUŽITÍ JINÝCH KONTRASTNÍCH LÁTEK

Vývoj nových kontrastních látek pro buněčné zobrazování je v současné době enormní. Jedním z důvodů je tendence pořizovat MR tomografie s vyšším magnetickým polem, přičemž klinicky schválené kontrastní látky v EU (tj. v současné době jen T1 kontrastní látky) jsou efektivnější na nižších polích (< 1,5 T). Dále je snaha zpřesnit detekci značených buněk. Toho lze mimo jiné dosáhnout použitím multimodálních (zpravidla bimodálních) kontrastních látek, kde lze kombinovat různé zobrazovací modalitativy nebo použít jiné než vodíková jádra. Tím můžeme využít vysoké citlivosti (>  $10^{-12}$  M) jedné modalitativy (např. PET, SPECT nebo optické zobrazování) s vy-



▲ Obr. 4A

▲ Obr. 4B

Obr. 4. **Vizualizace pankreatických ostrůvků značených fluorovou a fluorescenční kontrastní látkou v želatinovém fantomu.** A – přeložený  $^1\text{H}$  (šedá škála) s  $^{19}\text{F}$  (červená škála) MR obrazem a B – optické zobrazení. Fluorescenční signál z 200 ostrůvků (napipetovaných pouze do dvou zkumavek) koreluje s  $^{19}\text{F}$  MR signálem. Ostatní zkumavky obsahují neznačené buňky o různých koncentracích nebo pouze vodu.

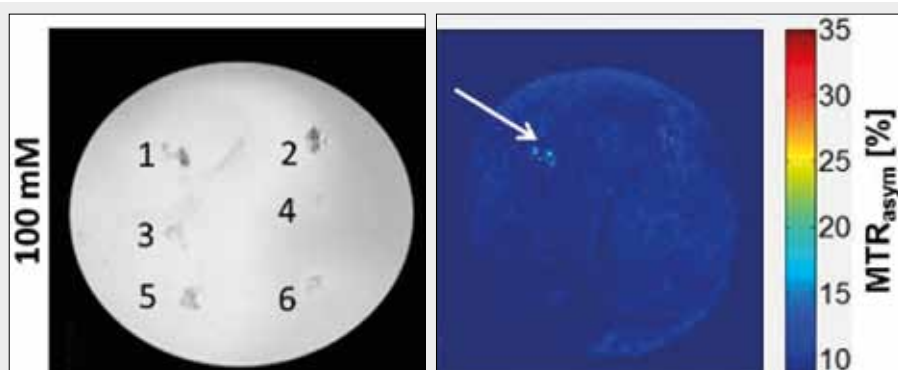
Fig. 4. **Visualization of pancreatic islets labeled with fluorine and fluorescent contrast agent in gelatin phantom.** A – overlaid  $^1\text{H}$  (gray scale) with  $^{19}\text{F}$  (red scale) MR image and B – optical image. The fluorescence signal from 200 islets (pipetted into only two tubes) correlates with the  $^{19}\text{F}$  MR signal. Other tubes contain unlabelled cells of varying concentrations or only water.

sokým prostorovým rozlišením druhé modality, což je v našem případě MR. Vývoj se také ubírá směrem ke konstrukci „chytrých“ kontrastních látek, které reflektují fyziologický stav buňky nebo její funkci. Pokud jsou specifické kontrastní látky vázány s léčivem, které je takto cíleně akumulováno v určité tkáni, mohou mít nejen diagnostické, ale i terapeutické použití.

Především v experimentech se můžeme při MR zobrazování buněk setkat s používáním i nevodíkových jader (12), např. izotopů  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{23}\text{Na}$ , nebo  $^{31}\text{P}$ . Pro buněčné zobrazování je výhodné použití zejména  $^{19}\text{F}$  kontrastních látek, protože rezonanční frekvence fluoru  $^{19}\text{F}$  leží velice blízko frekvenci vodíku  $^1\text{H}$  (cca o 6 % nižší vůči  $^1\text{H}$ ), proto jsou nároky na modifikaci hardwaru minimální. Výhodou je nulové pozadí při *in vivo* experimentech, protože fluor jako prvek se v živých organismech nevyskytuje. Další předností je možnost absolutní kvantifikace MR signálu, protože detekovaný signál je přímo

úměrný počtu fluorových atomů, což je pro monitorování přežívání transplantovaných buněk velice důležité (13, 14). Na obrázku 4 je uveden příklad zobrazení transplantovaných kmenových buněk značených  $^{19}\text{F}$  kontrastní látkou. Na obrázku je ukázán i příklad nejpoužívanější kombinace MR s jinou zobrazovací modalitou, což je v současné době optické zobrazování využívající fluorescence/bioluminescence. Použití  $T_1$  kontrastní látky je v kombinaci s optickým zobrazováním častější, protože je chemicky jednodušší takový multimodální kontrast vyrobit a navíc zde nedochází k tak velké absorpci světla při excitaci jako u  $T_2$  nanočástice.

Dalším typem kontrastu pro možné buněčné aplikace jsou kontrastní látky využívající přenosu saturace prostřednictvím chemické výměny mezi protony vody a vyměnitelnými protony dané diamagnetické či paramagnetické látky, označované jako CEST kontrasty (Chemical Exchange Saturation Transfer) (15). CEST kontrastní látky se vyznačují specif-

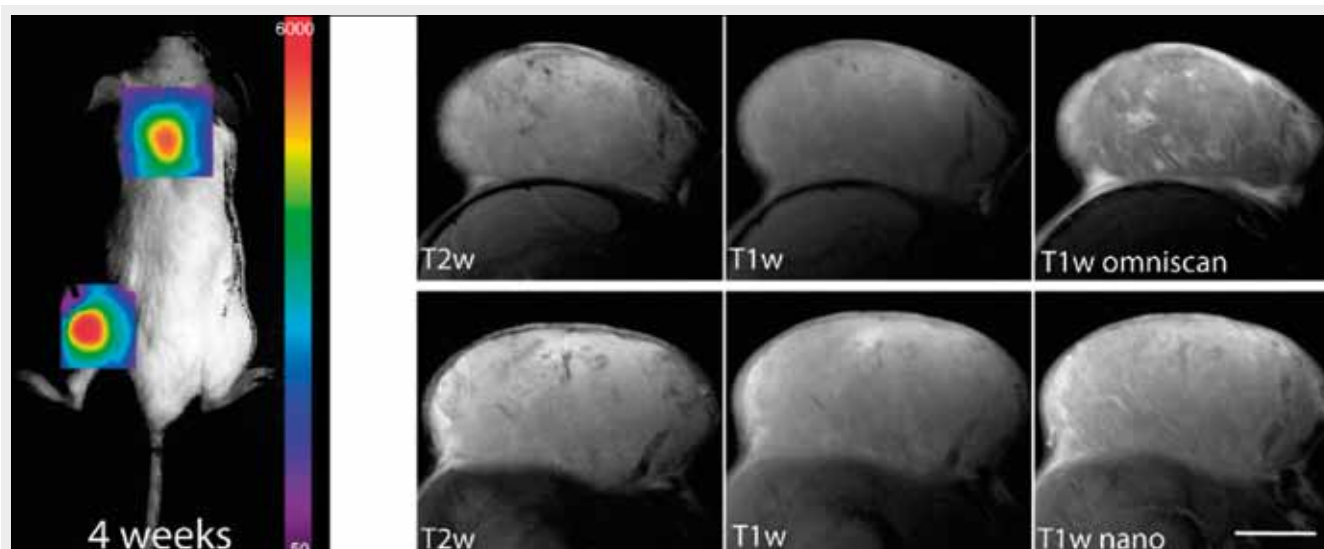


▲ Obr. 5A

▲ Obr. 5B

Obr. 5. **In vitro CEST MRI pankreatických ostrůvků v želatinovém fantomu.** A – fotografie fantomu (uvedeno: lanthanoid, způsob značení, počet ostrůvků): 1 – Eu, pinocytóza, 300; 2 – Yb, pinocytóza, 380; 3 – Eu, mikroporace, 60; 4 – Yb, mikroporace, 60; 5 – Eu, mikroporace, 150; 6 – Yb, mikroporace, 170. B – CEST mapa. Šipka ukazuje na značené ostrůvky s největším CEST kontrastem (převzato z Gálisová A, et al. Magnetic resonance visualization of pancreatic islets labeled by PARACEST contrast agents at 4.7 T. J Mol Imag Dynamic 2016; 5: 121(30)).

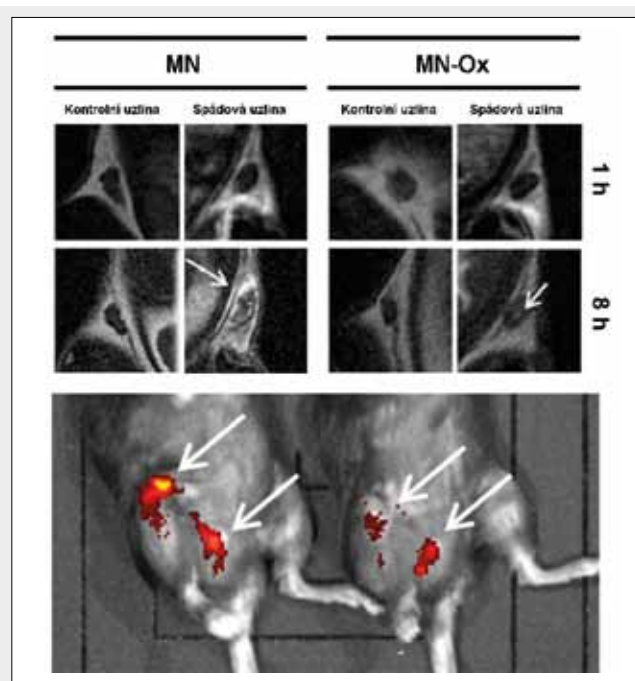
Fig. 5. **In vitro CEST MRI visualization of the labeled pancreatic islets in a gelatin phantom.** A reference MR image of a gelatine phantom containing the labeled pancreatic islets (A).  $MTR_{asym}$  maps of the phantom with saturation at 34 ppm for Eu-DO3A-ae (B). The labeling conditions for each group: 1 – pinocytosis Eu-DO3A-ae, 300 Pl; 2 – pinocytosis Yb-DO3A-ae, 380 Pl; 3 – microporation Eu-DO3A-ae 800V for 20 ms, 60 Pl; 4 – microporation Yb-DO3A-ae 800V for 20 ms, 60 Pl; 5 – microporation Eu-DO3A-ae 800V for 30 ms, 150 Pl; 6 – microporation Yb-DO3A-ae 800V for 30 ms, 170 Pl. The arrow points the islets which should be visualized at the chosen frequency offset (from Gálisová A, et al. Magnetic resonance visualization of pancreatic islets labeled by PARACEST contrast agents at 4.7 T. J Mol Imag Dynamic 2016; 5: 121(30)).



▲ Obr. 6

Obr. 6. **In vivo zobrazení tumoru.** Obrázek z bioluminescence (vlevo) a z magnetické rezonance (vpravo). Tumory před (1. a 2. sloupec) a po aplikaci kontrastní látky – horní řada: komerční kontrast Omniscan; dolní řada: multimodální nanotransportér založený na glykogenu konjugován s gadoliniem (Gd-DOTA) a fluorescenční značkou Dyomics-615-NHS (Dy-615) (převzato z Aasen SN, et al. A Novel nanoprobe for multimodal imaging is effectively incorporated into human melanoma metastatic cell lines. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21658–2180 (31))

Fig. 6. **In vivo tumor MR imaging.** Representative bioluminescence image of tumor growth in one of the NOD/SCID mice four weeks after injection of H1\_DL2 cells in the neck and flank area (left). Representative axial MR images of the neck tumors in the same mouse eight weeks after tumor cell injection. T2 weighted image, T1 weighted image before contrast injection, and T1 weighted image after injecting Omniscan and nanoprobe as contrast agent; scale bar, 5 mm (from Aasen SN, et al. A Novel nanoprobe for multimodal imaging is effectively incorporated into human melanoma metastatic cell lines. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21658–2180 (31))



▲ Obr. 7

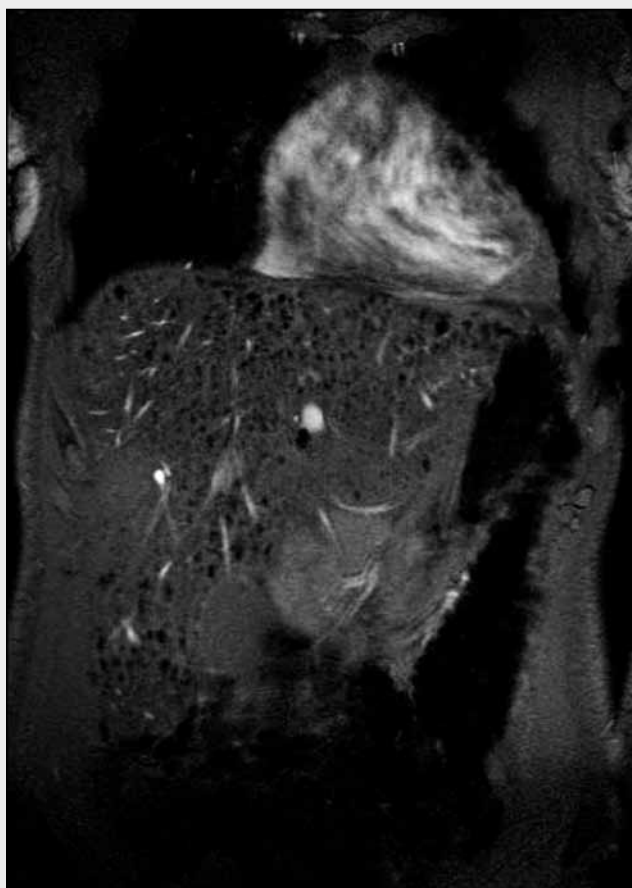
Obr. 7. **In vivo zobrazení lymfatických uzlin.** Nahoře MR snímky uzlin, po 8 hodinách po aplikaci kontrastní látky vidíme hyperintenzní signál u sentinelových uzlin v porovnání s uzlinami na druhé straně od místa aplikace kontrastní látky. Výsledek koreluje s fluorescenčním zobrazováním (dole), kde byly uzliny detekovány především na straně aplikace kontrastní látky.

Fig. 7. **In vivo lymph node imaging.** At the top of the MR imaging of the nodes, 8 hours after the contrast agent, we see a hyperintense signal in the sentinel lymph nodes compared to nodes on the other side of the contrast medium. The result correlates with fluorescence imaging (below), where nodes were detected primarily on the side contrast agent.

kými frekvenčními posuny, což umožňuje zobrazení různých buněk, které jsou označeny CEST kontrastem s odlišnou presaturační frekvencí. Např. izolované pankreatické ostrůvky by se mohly dle jejich velikosti různě označit a pak společně transplantovat a sledovat, který typ přežívá lépe. Podobným způsobem by bylo možné zobrazovat různě kultivované buňky apod. Příklad aplikace CEST kontrastu je uveden na obrázku 5.

V souvislosti s kontrastními látkami mluvíme často o nanomedicíně. Zásadní roli, zvláště při léčbě rakoviny, hraje velikost nanočástic. Využíváme toho, že tyto nanotransportéry neprostupují stěnou zdravé cévy, pokud je jejich velikost větší než 10 nm a ani nejsou secernovány z těla v ledvinách. Při nadměrně dilatovaných nádorových cévách naopak jejich stěnami prostupovat mohou, jedná se o tzv. EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention) (16–18). Jako teranostický nanotransportér lze použít materiály, které jsou organické, nebo anorganické povahy. Používané jsou například uhlíkové nanotrubky, lipozomy, fullerény, micely, nanosféry, polymerní nanočástice, polysacharidické materiály, emulze nebo dendrimery. Mohou být také použity proteiny, jako je například apoferitin nebo virová kapsida (19).

Tyto systémy, někdy nazývané v anglické literatuře jako Drug Delivery Systems, mohou sloužit jako adaptovatelné molekulární stavebnice pro cílené doručení aktivních komponent (gadoliniové komplexy pro zobrazování magnetickou rezonancí, fluorescenční barviva nebo radionuklidy pro zobrazovací metody nukleární medicíny) do tkáně pevných nádorů se samocílicím efektem díky své velikosti (EPR efekt) nebo díky selektivní vazbě na určitou tkáň, například na nádorové buňky (ligandové cílení). Významnou skupinou jsou polysacharidy, které představují biodegradovatelné polymer-



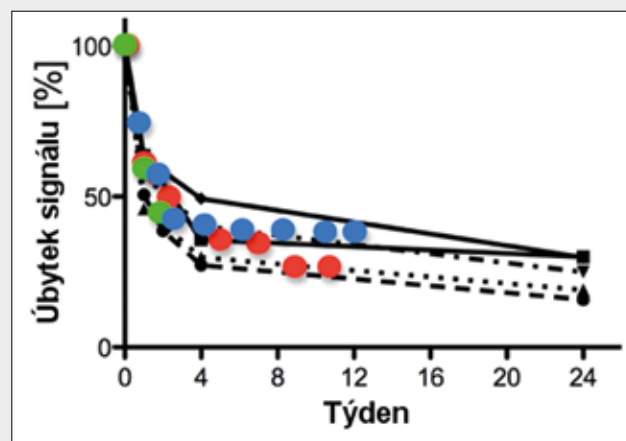
▲ Obr. 8

Obr. 8. **In vivo zobrazení SPIO značených pankreatických ostrůvků transplantovaných do lidských jater sekvencí gradientního echa.** MR měření bylo provedeno 1 den po transplantaci více než 385 000 pankreatických ostrůvků, které byly značeny in vitro 40 hodin SPIO kontrastní látkou. Ostrůvky jsou detekovány v jaterní tkáni jako hyperintenzní signál (převzato z Saudek F, et al. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans. Transplantation 2010; 90(12): 1602–1606 (25)).

Fig. 8. **Magnetic resonance imaging of transplanted pancreatic islets in patient on the day 1 after transplantation.** Areas of signal loss are attributed to the detected islets. This patient received 385 000 pancreatic islets labeled for 40 hours by SPIO contrast agent (from Saudek F, et al. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans. Transplantation 2010; 90(12): 1602–1606 (25)).

ní nosiče přírodního původu z obnovitelných zdrojů s výhodnými vlastnostmi pro použití v medicíně. Aktivní cílení může být dáno afinitou na receptory, které jsou pro zvolenou tkáň typické. Například v případě hepatocelulárních tumorů jde o afinitu D-galaktosylovaných struktur k asialoglykoproteinovým receptorům (20), které jsou vysoce exprimované v hepatocelulárních karcinomech a na pevné vazbě nanomolárních antagonistů muskarinových acetylcholinových receptorů na melanomové buňky (21, 22). Příklad použití takového typu kontrastu je na obrázku 6.

Dalším zástupcem z drug delivery systémů je kontrast využívající manan. Manan je stejně jako glykogen biokompatibilní a biodegradovatelný polysacharid, který je vychytáván především v makrofázích a dendritických buňkách. Toho by se mohlo využít pro detekci sentinelových lymfatických uzlin a metastáz. Příklad použití tohoto multimodálního kontrastu pro MR a optické zobrazování znázorňuje obrázek 7.



▲ Obr. 9

Obr. 9. **Srovnání relativního úbytku transplantovaných pankreatických ostrůvků u čtyř pacientů hodnocených v klinické studii (25) a u různých zvířecích modelů (červená: potkan (32), zelená: myš (33), modrá: potkan (34)).**

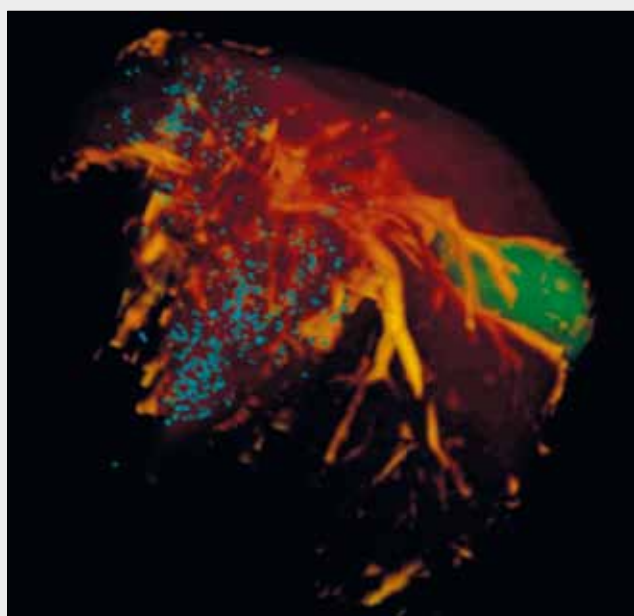
Fig. 9. **Comparison of the relative decrease of transplanted pancreatic islets in four patients evaluated in a clinical trial (25) and in different animal models (red: rat (32), green: mouse (33), blue: rat (34)).**

## PŘÍKLADY STUDIÍ V KLINICKÉ MEDICÍNĚ

Transplantace buněk v klinické praxi nejsou příliš rozšířené. Kmenové buňky se používají ve velice omezené míře a mají řadu nežádoucích účinků. Probíhají klinické studie, které využívají kmenové buňky pro léčbu poškození šlach a chrupavek, onemocnění srdce včetně infarktu myokardu, obnovu nervových buněk u řady onemocnění (Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, roztroušené sklerózy), poškození míchy, diabetu 1. typu, regenerace kostí i svalů, artritidy, poruchy krvetvorby, poškození zraku i sluchu, nebo autoimunitních onemocněních. Výsledky jejich použití nejsou zcela přesvědčivé (23). Reálné klinické uplatnění měla aplikace kontrastních látek v případech značení transplantovaných pankreatických ostrůvků (24–26). Ve všech případech se použila T2 kontrastní látka založená na SPIO nanočásticích.

Příkladem je klinická pilotní studie, která byla provedena na základě úspěšných pokusů na zvířatech a dalších *in vitro* pokusech s lidskými pankreatickými ostrůvkem na Pracovišti radiodiagnostiky a intervenční radiologie (ZRIR) v IKEM (25). V této studii dostalo osm pacientů různě dlouho značené ostrůvky T2 kontrastní látkou Resovist®; doba značení ostrůvků byla dána především stavem pacienta a s tím spojenými požadavky transplantčních chirurgů. Výběr kontrastní látky byl dán jednak tím, že Resovist® prokazoval vynikající výsledky u *in vitro* pokusů a na zvířecích modelech, a zároveň byl klinicky schválený. Zde je nutné podotknout, že produkce této látky byla zastavena, a to pouze z ekonomických důvodů, nikoliv zdravotních. Proto je v současné době nepravděpodobné, že by tato studie v nejbližší budoucnosti v České republice pokračovala.

V této klinické studii byli pacienti sledováni 6 měsíců po transplantaci pankreatických ostrůvků, kromě biologických parametrů se sledoval i úbytek hypointenzních signálů,



▲ Obr. 10

**Obr. 10. 3D rekonstrukce myších jater s transplantovanými pankreatickými ostrůvky.** 3D vizualizace byla provedena z MR obrazů naměřených *in vivo*. Červená barva reprezentuje jaterní tkáň, žlutá cévy, zelená žlučník a modrá SPIO značené pankreatické ostrůvky.

**Fig. 10. 3D reconstruction of mouse liver with transplanted pancreatic islets.** 3D visualization was performed from MR images measured *in vivo*. The red color represents liver tissue, yellow blood vessels, green gall bladder, and blue SPIO-labeled pancreatic islets.

kteří v MR obrazech představovaly transplantované ostrůvky (obr. 8), a to jak jejich celkový počet, tak i jejich celková plocha. Studie potvrdila, že transplantace značených ostrůvků je bezpečná metoda, jejíž rizika nepřevyšují rizika u transplantace ostrůvků neznačených. Výsledky na MR ukázaly, že příjemce ztratí během prvního týdne 50 % a více transplantovaných ostrůvků, což bylo v souladu s hypotézami patologů (27–29), a poté, pokud nedojde k rejekci, je již úbytek transplantované tkáně velice pozvolný. Tyto výsledky relativního úbytku transplantovaných ostrůvků byly stejné jak při kvantifikaci jejich množství, tak i pro kvantifikaci velikosti hypointenzní plochy, kterou v jaterní tkáni zaujímala. Problémem je absolutní kvantifikace SPIO značených ostrůvků, u pacientů bylo detekováno mezi 869 a 2133 hypointenzních ploch, což je velice malé číslo, vezmeme-li v potaz, kolik ostrůvků bylo celkově transplantováno (385 000–687 000). Jedním z důvodů takového rozdílu může být vliv tzv. „blooming“ efektu, kdy nejsme schopni odlišit jednotlivý ostrůvek od shluku ostrůvků díky velkému efektu SPIO nanočástic na okolní magnetické pole. Dalším důvodem je nedostatečné rozlišení a citlivost MR metody, kdy ostrůvky s menším obsahem železa byly nedetekovatelné.

Nejdůležitější ale je, že průběh relativního úbytku transplantovaných ostrůvků v této klinické studii má stejný průběh jako ve zvířecích modelech (obr. 9).

Fakt, že výsledky z experimentálních studií provedených na zvířatech a klinické studie jsou stejné, potvrzuje, že zvířecí modely mohou být relevantní ke klinickým podmínkám transplantací. Proto užití experimentálních zvířat pro tyto účely je opodstatněné a i v budoucnu můžeme ověřovat vědecké hypotézy týkající se distribuce, migrace a přežívání transplantovaných buněk v organismu pomocí pokusů na experimentálních zvířatech.

## ZÁVĚR

Molekulární zobrazování pomocí magnetické rezonance je nepochybně vhodný nástroj pro detekci buněk *in vivo*, tyto buňky je ale nezbytné značit pomocí optimální kontrastní látky. Postupy značení buněk jsou známy, dobře popsány a nepředstavují podstatný problém. Značené buňky jsou životaschopné a kontrastní látka může být internalizována v buňce dostatečně dlouhou dobu. U specifického značení buněk je nutné počítat s tím, že množství kontrastní látky vázané na membránu je nižší, a proto je i celkové množství kontrastní látky označující buňku menší než bývá u dlouhého (tj. 12 a více hodin) nespecifického značení. Efektivnější z hlediska zobrazení se zdá užití T2 kontrastních látek založených na SPIO nanočásticích, nicméně v současné době nejsou v EU tyto látky schválené pro klinické použití. Komerčně dostupné T1 kontrastní látky nejsou tkáňově specifické ani nereagují na chemické a další vlastnosti okolí (např. na pH, teplota).

Budoucnost patří zcela jistě funkčním, multimodálním teranostickým kontrastním látkám s vysokou specificitou. Nové kontrastní látky mohou být založeny na zcela jiných sloučeninách, např. na gadoliniem dopovaných uhlíkatých nanotrubicích, které by mohly poskytovat řádově vyšší relaxivitu než dnes používané látky; bohužel u těchto látek je problém jejich toxicita. Specificita kontrastních látek by mohla umožňovat nejen selektivní zobrazování určitých tkání nebo buněk, ale uvést do rutinní praxe tímto také drug delivery systémy – tedy být nosiči léčivých látek, což by přineslo revoluci v terapii. Léčba by tak mohla být sledována takřka v „přímém“ přenosu. Multimodalita, ať se jedná v magnetické rezonanci o použití jiného jádra než  $^1\text{H}$  nebo jiné zobrazovací modalit, zcela jistě může zpřesnit detekci buněk. Z hlediska humánní medicíny a preklinického výzkumu se jeví jako nejužitečnější kombinace MR/PET, která kombinuje extrémní citlivost PET a vynikající prostorové rozlišení poskytované MR. Toto spojení metod je komplementární, neboť dává informace funkční a anatomické.

V současné době jsme ve fázi, kdy dokážeme zobrazit buňku nebo shluk buněk ve fantomu nebo *in vitro/in vivo*. Abychom dokázali zobrazit transplantovanou buňku pomocí magnetické rezonance, musíme splnit několik podmínek, které vyžadují multioborové znalosti (buněčná biologie, medicína, chemie, fyzika). V podstatě se jedná o čtyři postupné kroky: izolace buněk, značení buněk vhodnou kontrastní látkou, transplantace a samotné zobrazování. Pokud jsou všechny tyto kroky dobře provedené, můžeme úspěšně detekovat transplantované buňky (obr. 10). Pokud ale jakýkoliv z výše uvedených kroků selže, buňky zobrazit nedokážeme.

## LITERATURA

1. Jendelova P, Herynek V, DeCroos J, Glogarova K, Andersson B, Hajek M, et al. Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 2003; 50(4): 767–776.
2. Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Andersson B, et al. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* 2004; 76(2): 232–243.
3. Jirak D, Kriz J, Herynek V, Andersson B, Girman P, Burian M, et al. MRI of transplanted pancreatic islets. *Magn Reson Med* 2004; 52(6): 1228–1233.
4. Seppenwoolde JH, Viergever MA, Bakker CJ. Passive tracking exploiting local signal conservation: the white marker phenomenon. *Magn Reson Med* 2003; 50(4): 784–790.
5. Cunningham CH, Arai T, Yang PC, McConnell MV, Pauly JM, Conolly SM. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 2005; 53(5): 999–1005.
6. Mani V, Briley-Saebo KC, Itskovich VV, Samber DD, Fayad ZA. Gradient echo acquisition for superparamagnetic particles with positive contrast (GRASP): sequence characterization in membrane and glass superparamagnetic iron oxide phantoms at 1.5T and 3T. *Magn Reson Med* 2006; 55(1): 126–135.
7. Stuber M, Gilson WD, Schar M, Kedziorek DA, Hofmann LV, Shah S, et al. Positive contrast visualization of iron oxide-labeled stem cells using inversion-recovery with ON-resonant water suppression (IRON). *Magn Reson Med* 2007; 58(5): 1072–1077.
8. Patil S, Bieri O, Scheffler K. Echo-dephased steady state free precession. *MAGMA* 2009; 22(5): 277–285.
9. Robson MD, Gatehouse PD, Bydder M, Bydder GM. Magnetic resonance: an introduction to ultrashort TE (UTE) imaging. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27(6): 825–846.
10. Zhang L, Zhong X, Wang L, Chen H, Wang YA, Yeh J, et al. T(1)-weighted ultrashort echo time method for positive contrast imaging of magnetic nanoparticles and cancer cells bound with the targeted nanoparticles. *J Magn Reson Imaging* 2011; 33(1): 194–202.
11. Holmes JEBGM. MR imaging with ultrashort TE (UTE) pulse sequences: Basic principles. *Radiography* 2005; 11(3): 163–174.
12. Helfer BM, Balducci A, Nelson AD, Janjic JM, Gil RR, Kalinski P, et al. Functional assessment of human dendritic cells labeled for in vivo (19)F magnetic resonance imaging cell tracking. *Cytotherapy* 2010; 12(2): 238–250.
13. Ahrens ET, Flores R, Xu H, Morel PA. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(8): 983–987.
14. Srinivas M, Morel PA, Ernst LA, Laidlaw DH, Ahrens ET. Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magn Reson Med* 2007; 58(4): 725–734.
15. Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson* 2000; 143(1): 79–87.
16. Hoffman AS. The origins and evolution of „controlled“ drug delivery systems. *J Control Release* 2008; 132(3): 153–163.
17. Talelli M, Rijcken CJ, van Nostrum CE, Storm G, Hennink WE. Micelles based on HPMa copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(2): 231–239.
18. Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* 2010; 21(5): 797–802.
19. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(5): 1310–1316.
20. Soenen SJ, Brisson AR, Jonckheere E, Nuytten N, Tan S, Himmelreich U, et al. The labeling of cationic iron oxide nanoparticle-resistant hepatocellular carcinoma cells using targeted magnetoliposomes. *Biomaterials* 2011; 32(6): 1748–1758.
21. Matthew E, Laskin JD, Zimmerman EA, Weinstein IB, Hsu KC, Engelhardt DL. Benzodiazepines have high-affinity binding sites and induce melanogenesis in B16/C3 melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(6): 3935–3939.
22. Oppitz M, Busch C, Garbe C, Drews U. Distribution of muscarinic receptor subtype M3 in melanomas and their metastases. *J Cutan Pathol* 2008; 35(9): 809–815.
23. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 11–22.
24. Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, et al. Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant* 2008; 8(3): 701–706.
25. Saudek F, Jirak D, Girman P, Herynek V, Dezortova M, Kriz J, et al. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans. *Transplantation* 2010; 90(12): 1602–1606.
26. Malosio ML, Esposito A, Brigatti C, Palmisano A, Piemonti L, Nano R, et al. MR imaging monitoring of iron-labeled pancreatic islets in a small series of patients: islet fate in successful, unsuccessful, and autotransplantation. *Cell Transplant* 2015; 24(11): 2285–2296.
27. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002; 51(1): 66–72.
28. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 2005; 77(5): 587–597.
29. Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 1996; 45(9): 1161–1167.
30. Gálisová A, Jirák D, Krchová T, Herynek V, Fábryová E, Kotek J, et al. Magnetic resonance visualization of pancreatic islets labeled by PARACEST contrast agents at 4.7T. *J Mol Imag Dynamic* 2016; 6(121).
31. Aasen SN, Pospisilova A, Eichler TW, Panek J, Hruby M, Stepanek P, et al. A novel nanoprobe for multimodal imaging is effectively incorporated into human melanoma metastatic cell lines. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21658–21680.
32. Herynek V, Berkova Z, Dovolilova E, Jirak D, Kriz J, Girman P, et al. Improved detection of pancreatic islets in vivo using double contrast. *Contrast Media Mol Imaging* 2011; 6(4): 308–313.
33. Jirak D, Kriz J, Strzelecki M, Yang J, Hasilo C, White DJ, et al. Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification. *MAGMA* 2009; 22(4): 257–265.
34. Kriz J, Jirak D, Berkova Z, Herynek V, Lodererova A, Girman P, et al. Detection of pancreatic islet allograft impairment in advance of functional failure using magnetic resonance imaging. *Transpl Int* 2012; 25(2): 250–260.