

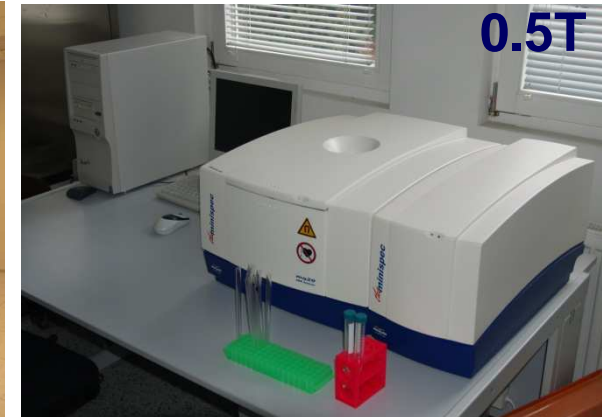
MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÉ ZOBRAZOVÁNÍ IN VIVO

T1 a T2 kontrastní látky

Milan Hájek 15. 1. 2014

- Molekulární a buněčné zobrazování
- Molekulární a buněčné zobrazování - Magnetická Rezonance
- Kontrastní látky pro MR
- Theranostika

MR skupina, ZRIR IKEM, Praha



Siemens Avanto 1.5T

Siemens Trio 3T

Bruker Biospec 4.7/20

Bruker Minispec 0.5T-1T

Buněčné transplantace

STEM cell research opens new possibilities for repairing the nervous system

(Rosario C.M. et al. 1997, Lu D et al 2001, Nakano K. et al 2001...etc)

Buněčné MR zobrazování

Prelabeling of cells by contrast agents in vitro before transplantation and in vivo observation of their fate

For review: Modo M et al Molecula Imaging 4:143-164, 2005

Metabolický profil
in vivo MR spektroskopii

Production of endogenous compounds,
changes in metabolite concentrations

Bollard ME et al. 2005

Molekulární a buněčné zobrazování

**diagnostická metoda založená
na pozorování buněk a
molekulárních struktur *in vivo*
pomocí různých zobrazovacích modalit
a s použitím nových diagnostických
a terapeutických markerů a technik**

Molekulární a buněčné zobrazování

Základní postupy

Přímé pozorování molekulárních a buněčných struktur

Optické metody

MR spektroskopie

Nepřímé pozorování

využití vazby mezi buněčnou strukturou
a markerem (endo- nebo exogenní látkou)

Konstrukce kontrastních látek

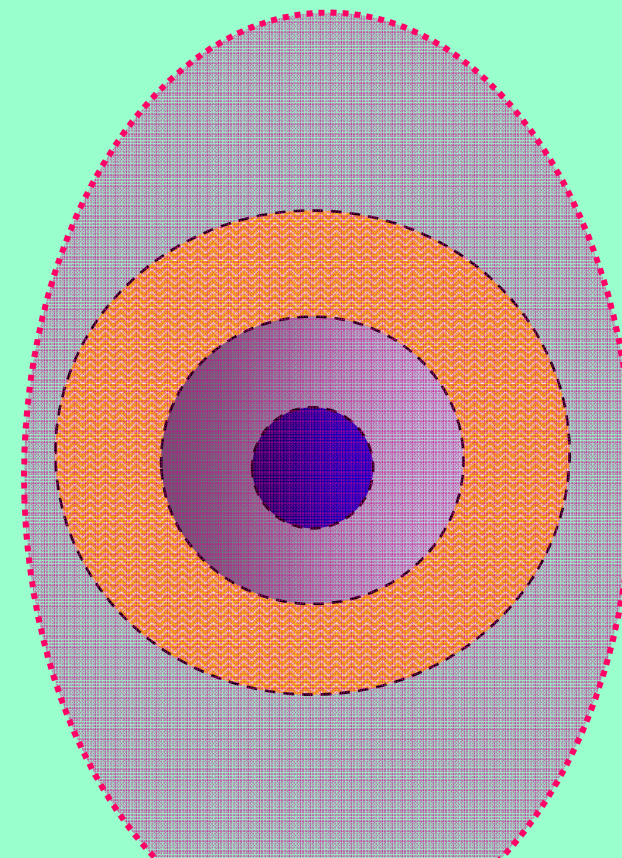
(nanotechnologie)

Jádro (nanočástice Fe. Lanthanoidy...)
(zdroj změn magnetického pole)

povrch
(kontrola základních biochemických parametrů)

ligandy
(kontrola připojení k buňkám)

KONTRASTNÍ LÁTKA

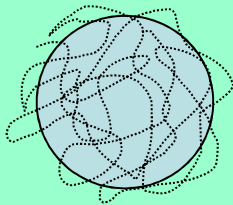


+ Buňky \longrightarrow Buněčná kontrastní látka

Buněčné KL - “chytré KL”

CLIO-NRP-V7 + FITC + ^{125}I \Rightarrow MR+Optické+Isotopové

CLIO
SPIO



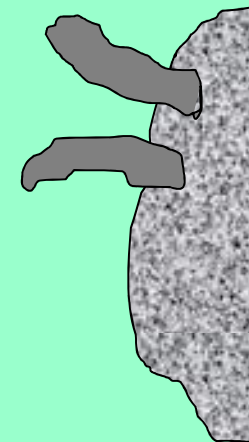
Avidin



Biotin
Vitamin H



T cell receptor



FITC (fluorescein ITC)



^{125}I



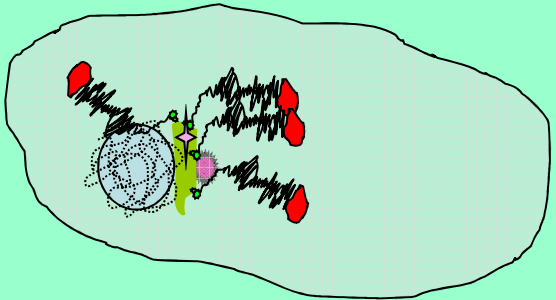
NPR-V7

CD8+ T cell

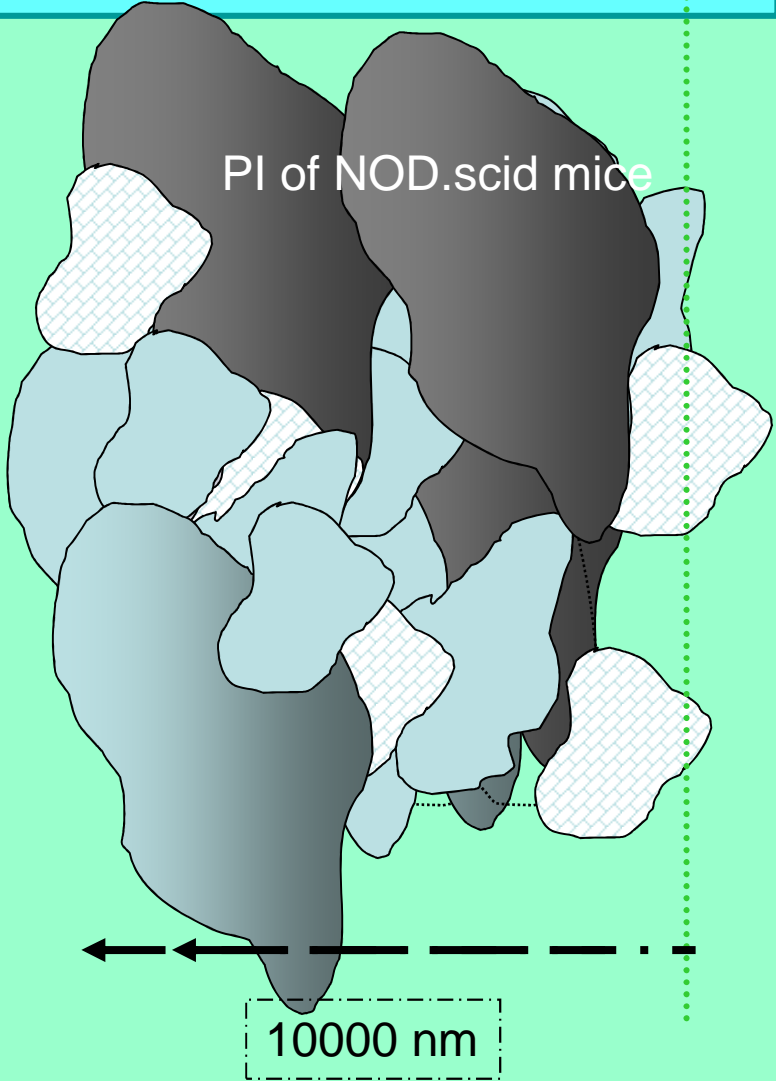
Moore A et al. Diabetes 53:1459-1466, 2004.

Infiltrace označených 8.3-CD8⁺ buněk do pankreatických ostrůvků

CLIO-NRP-V7-labeled
8.3-CD8⁺ T-cells



120 nm



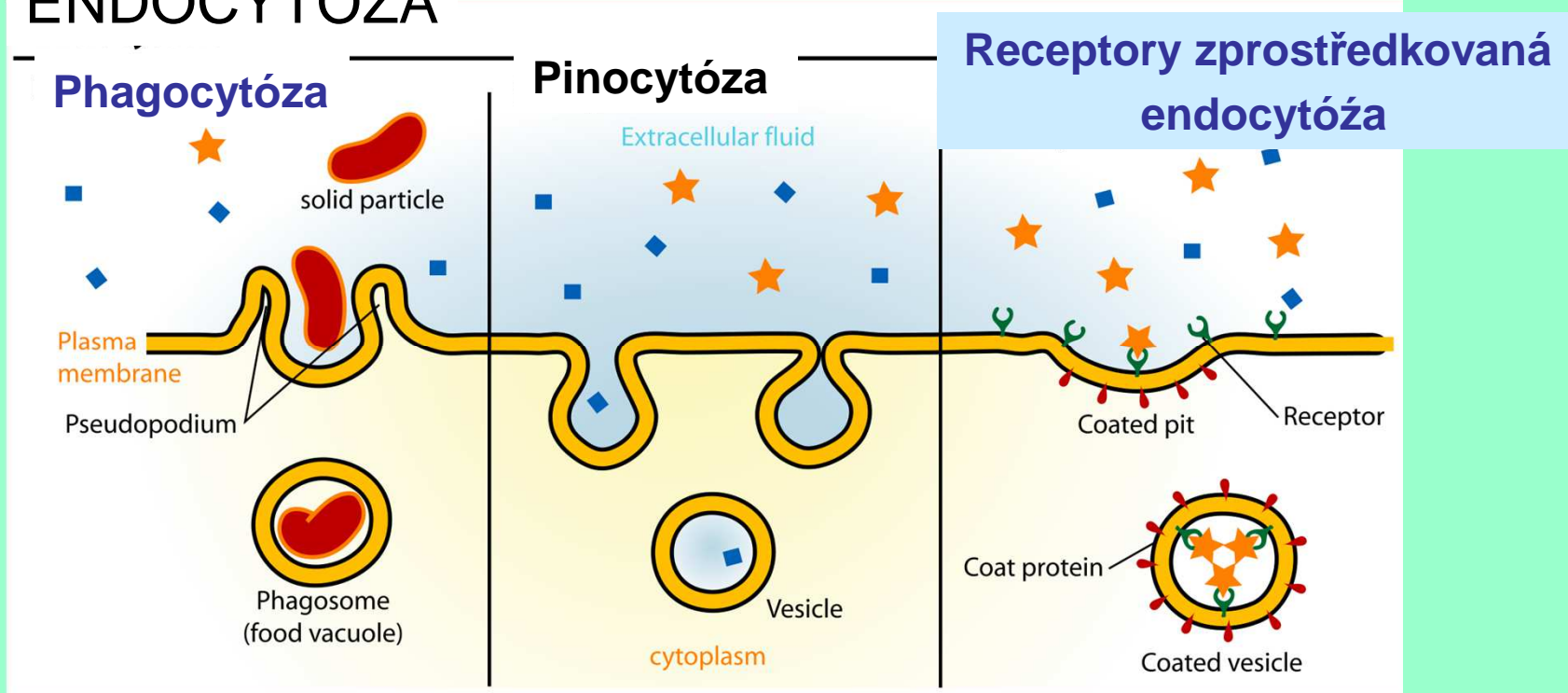
PI of NOD.scid mice

10000 nm

Moore A et al. Diabetes 53:1459-1466, 2004.

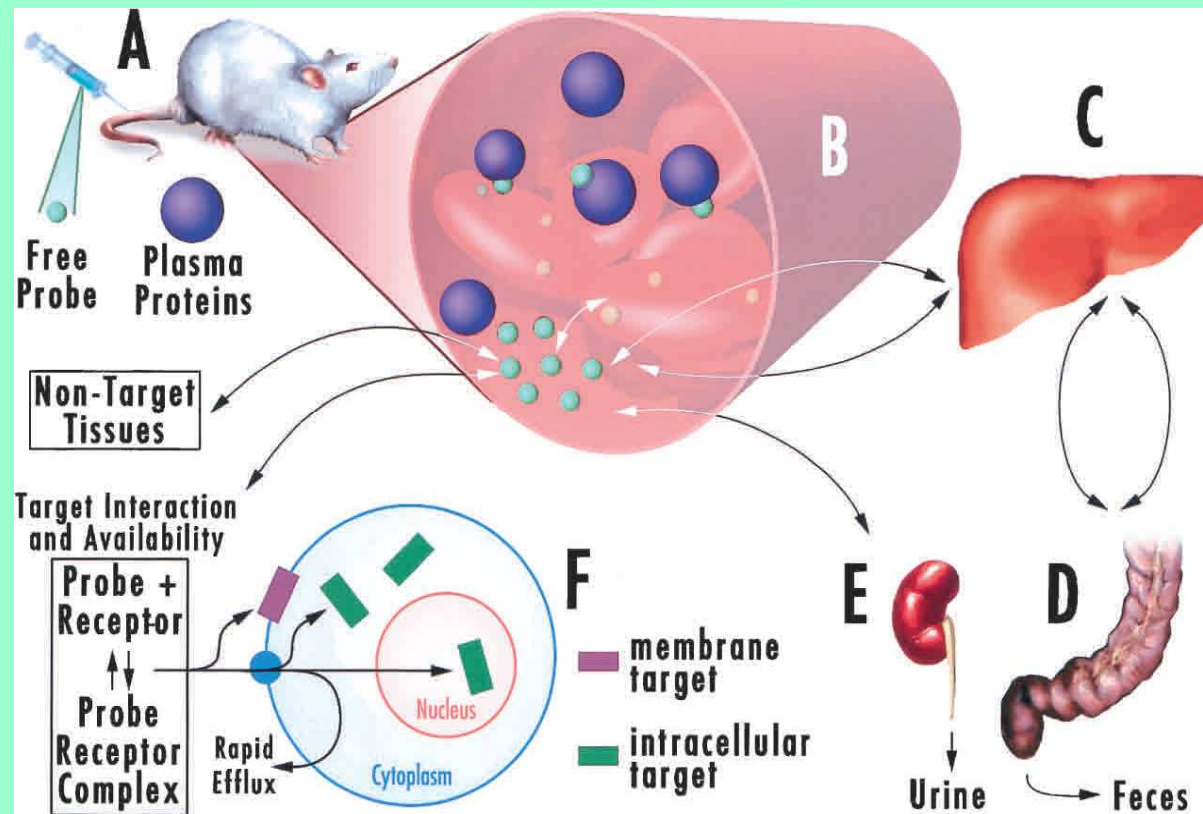
Transport markerů do buněk

ENDOCYTÓZA



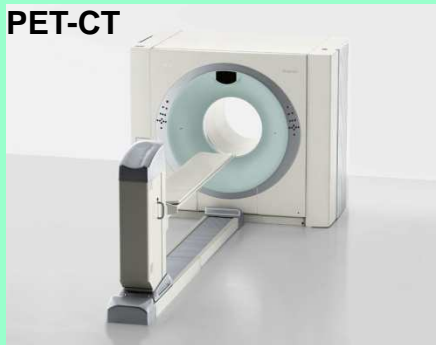
Transportní kanály

Osud markerů

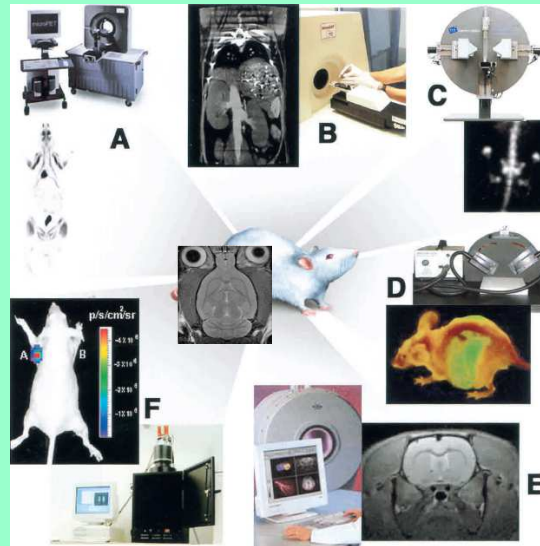


Zobrazovací metody pro molekulární zobrazování

PET-CT



pozitronová emisní tomografie - PET



SPECT-CT



jednofotonová emisní výpočetní tomografie - SPECT



počítačová tomografie
CT



magnetická rezonance
MR



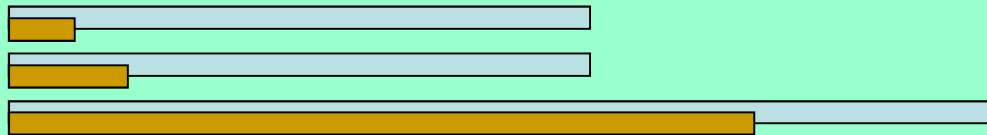
ultrazvuk - US

Techniky molekulárního zobrazování

Citlivost	NÍZKÁ			VYSOKÁ
Detekce	orgánů	tkání	buněk	molekul

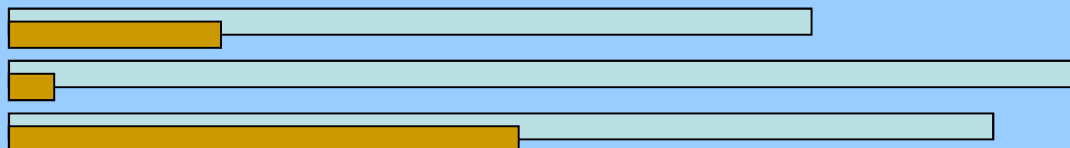
Radionuklidové metody

- Gamma kamera
- SPECT
- PET



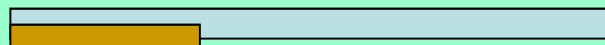
MR

- MR zobrazování
- MR spektroskopie
- MRI s kontrastem



CT

- CT s kontrastem



Optické zobrazování

- Fluorescence
- Bioluminiscence

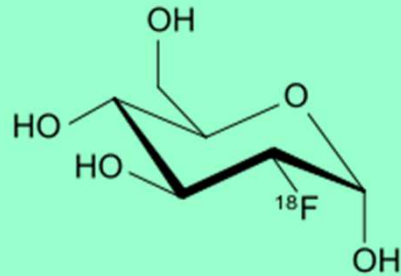


Zobrazovací techniky - experimentální

	EM spectrum	resolution	Sensitivity	λ, f	cost
PET	γ rays (high energy)	1-2 mm	10^{-11} - 10^{-12} mol/L	>0.01 nm >40000THz	\$\$\$\$
SPECT	γ rays (lower energy)	1-2 mm	10^{-11} - 10^{-12} mol/L	>0.01 nm >40000THz	\$\$\$
OPTICAL Bioluminiscence	visible	3-5 mm	10^{-15} - 10^{-17} mol/L	300GHz-380THz 360-790nm	\$
OPTICAL Bioluminiscence	visible IR	3-5 mm	10^{-9} - 10^{-12} mol/L	700-900nm 300GHz-380THz	\$\$
MRI	radiowaves	25-100 μ m	10^{-3} - 10^{-5} mol/L	60-800 MHz 5-0.4m	\$\$\$\$
MRS	radiowaves	1-2 mm	10^{-2} - 10^{-3} mol/L	60-1000 MHz 5-0.3m	\$\$\$\$
CT	X-ray	25-100 μ m	?	10-0.01 nm 40000THz	\$\$
US	hf sound	50-500 μ m	?	20Hz-20kHz ~km	\$

$$\lambda = 2.998 \cdot 10^8 \text{ m/s} * f[\text{Hz}]$$

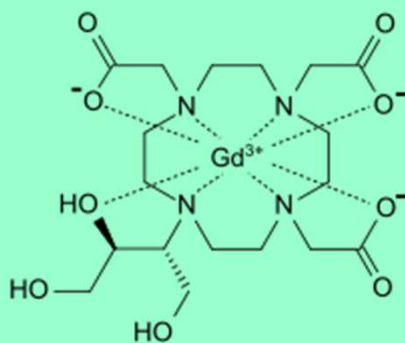
MI – koncentrace sondy (probe)



MV 181,14

potřebné množství pro „zviditelnění“ u
člověka $\approx 10\text{-}20\text{ ng}$

18F fluorodeoxyglukóza



MV 604.72

Dóza 0,1-0,2 mmol/kg

Na 70 kg člověka $\approx 10\text{g}$

GADOVIST

Pozitronová emisní tomografie - PET

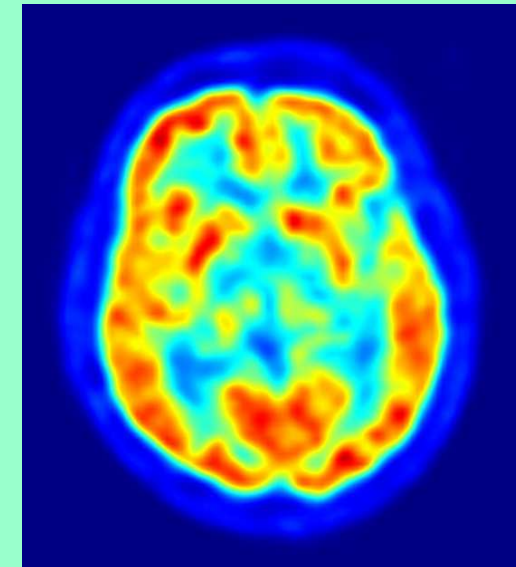
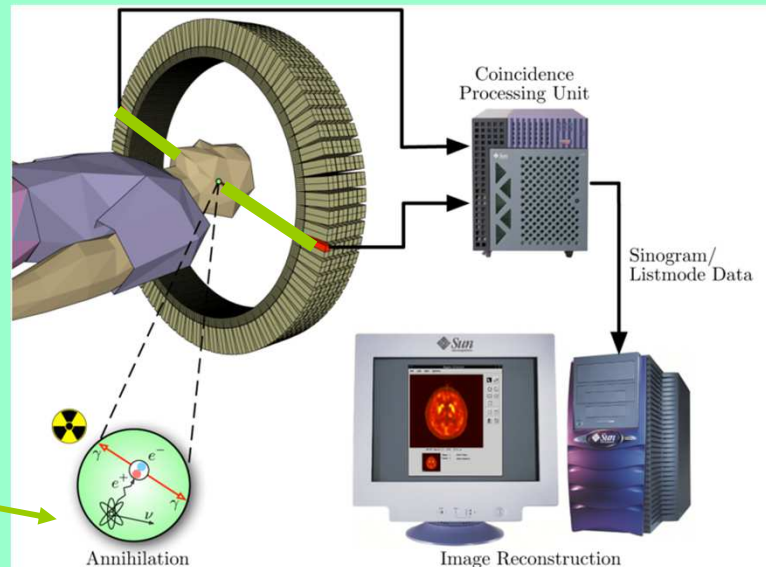
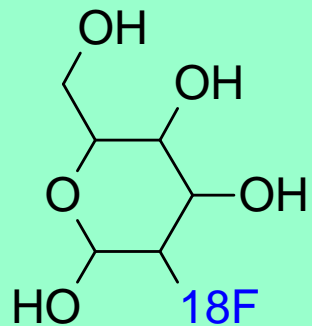
Fluorodeoxyglukóza (^{18}F FDG) – metabolismus glukózy - tumory

^{11}C [raclopride](#) – metabolismus dopaminu

^{18}F fallypride

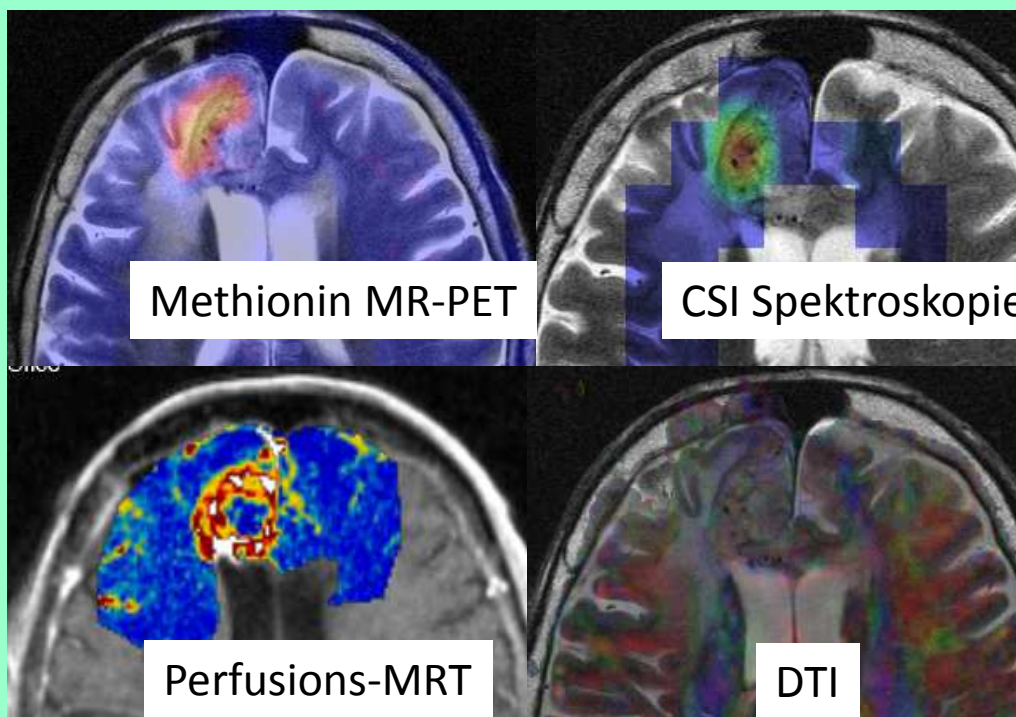
1974 - 1. PET pacienta (Michael E. Phelps)

FDG



2010 – klinické testy hybridního PET–MR

- ekonomika provozu ?
- význam pro pacienty a výzkum ?

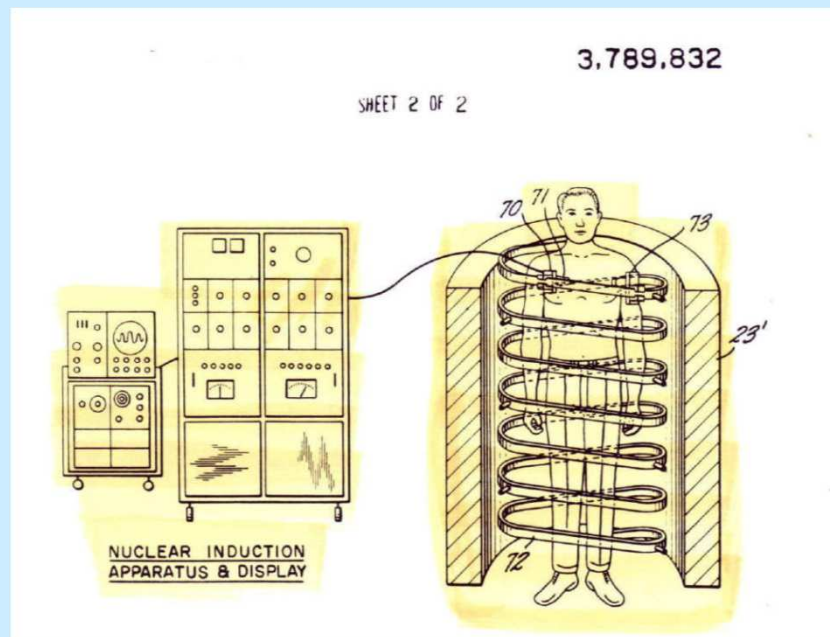


Magnetická rezonance – MR

1945 – objev nukleární magnetické rezonance

1971-1975 – první zobrazovací experimenty

Vytvoření mapy intenzity signálu metabolitů (zejména vody) za použití gradientů magn. pole



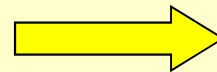
Rozlišovací schopnost MR zobrazování a MR spektroskopie

	1D mm	3D mm ³
μ MRI	0.04 < 0.005	0.05
mMRI	0.1	0.1
MRI	0.5 - 1	0.5 - 1
μ MRS	1-5	20 - 100
¹ H MRS	5-20	1000 - 4000
³¹ P MRS	20	8000

MR molekulární zobrazování

Přímé pozorování

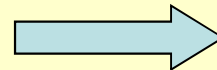
- MR zobrazování
- MR spektroskopie



Nízká citlivost

Nepřímé pozorování

- Kontrastní látky
- Specifické kontrastní látky



Zvýšení citlivosti
specificity

MR molekulární zobrazování

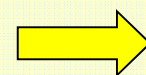
Přímé pozorování

MR zobrazování



nízká citlivost

MR spektroskopie

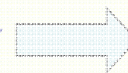


- velmi nízká citlivost
- skutečné molekuly

MRI – nepřímé pozorování

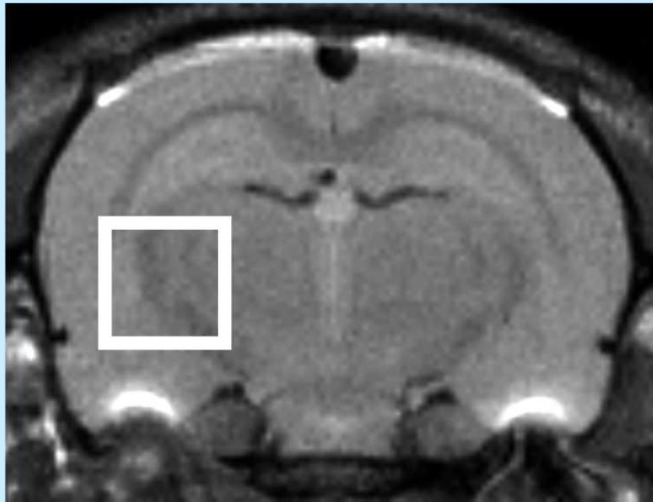
Specifické kontrastní látky

podskupina kontrastních látek



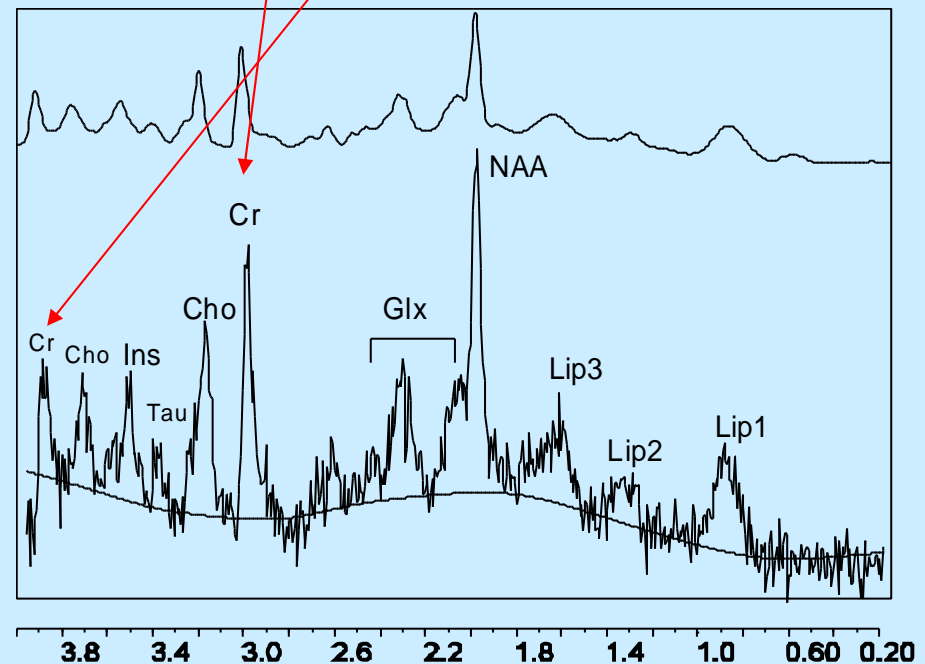
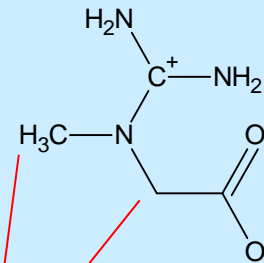
zvýšení - citlivosti
- specificity

MR spektroskopie



MRI
4.7T, rozlišení 0.14 mm

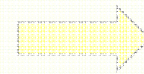
MRS
VOI 42.8 mm³ (3.5x3.5x3.5mm)
STEAM TE/TR=3/5000 ms



MR molekulární zobrazování

Přímé pozorování

MR zobrazování



nízká citlivost

MR spektroskopie

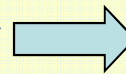


- velmi nízká citlivost
- skutečné molekuly

MRI – nepřímé pozorování

Specifické kontrastní látky

podskupina kontrastních látek



zvýšení - citlivosti
- specificity

Kontrastní látky (KL)

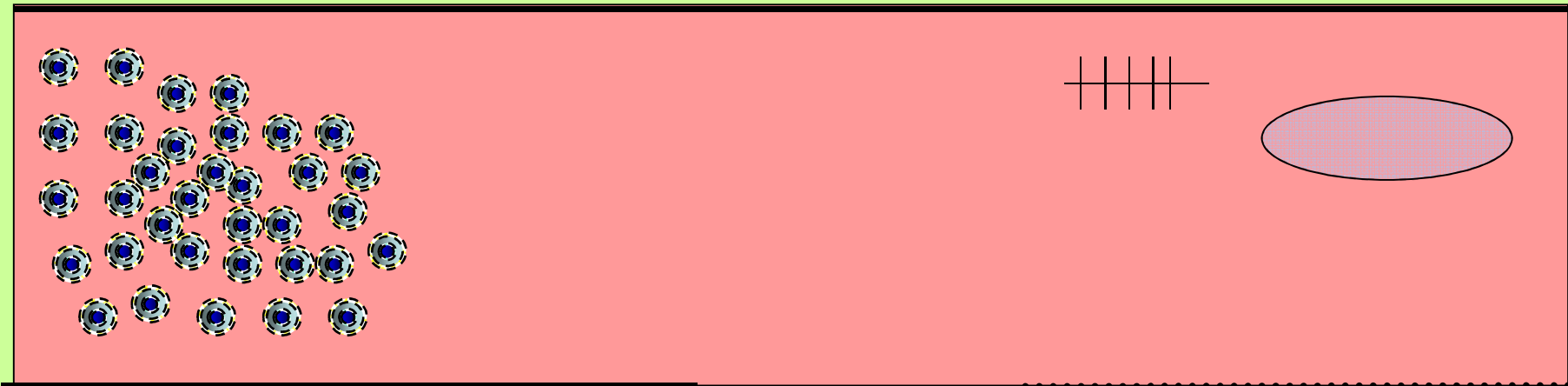
(nespecifické, buněčné, molekulární)

Injekce kontrastní látky do těla změní relaxační časy molekul vody. Výsledek je změna kontrastu v MR obraze .

- **Struktura kontrastních látek**
 - **Paramagnetické KL**
 - **Superparamagnetické KL**
- **MR buněčné KL**

Transport KL v těle

Angiografie s KL



Nespecifická KL v EC
prostoru

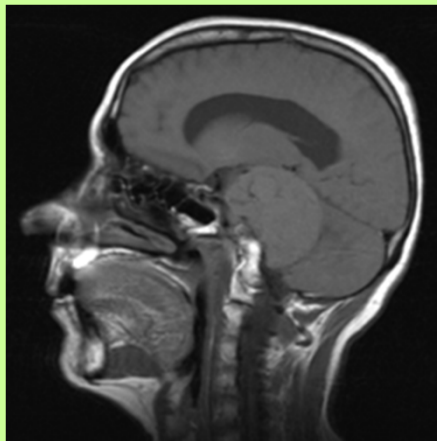
Specifická KL

Molekulární zobrazování

Kontrastní látky

$$\text{Relaxivita (R1,R2)} = 1/T1, \uparrow \uparrow T2$$

T1
obraz

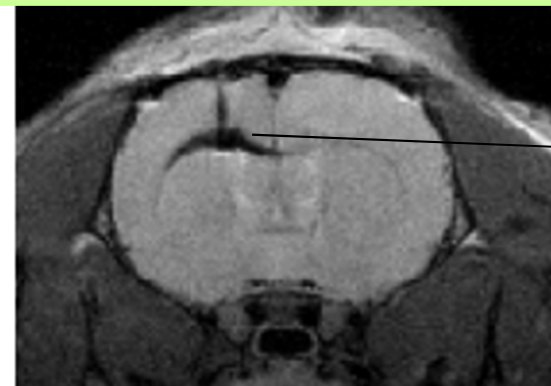
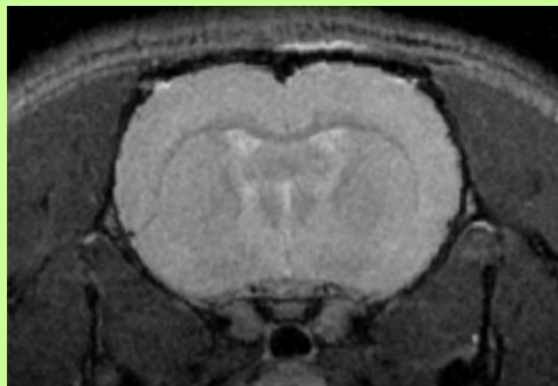


+ KL
→



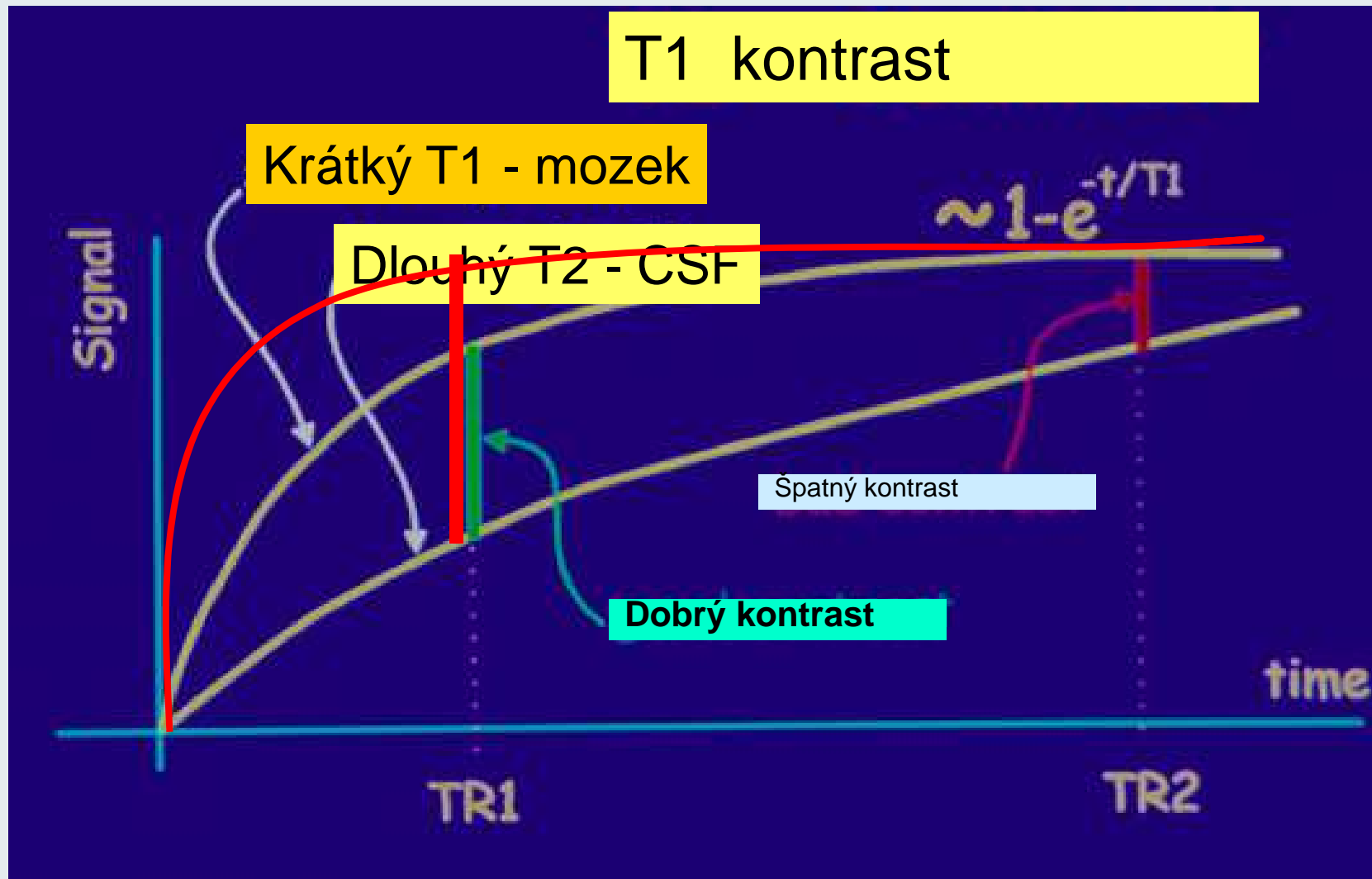
T1
↓

T2
obraz

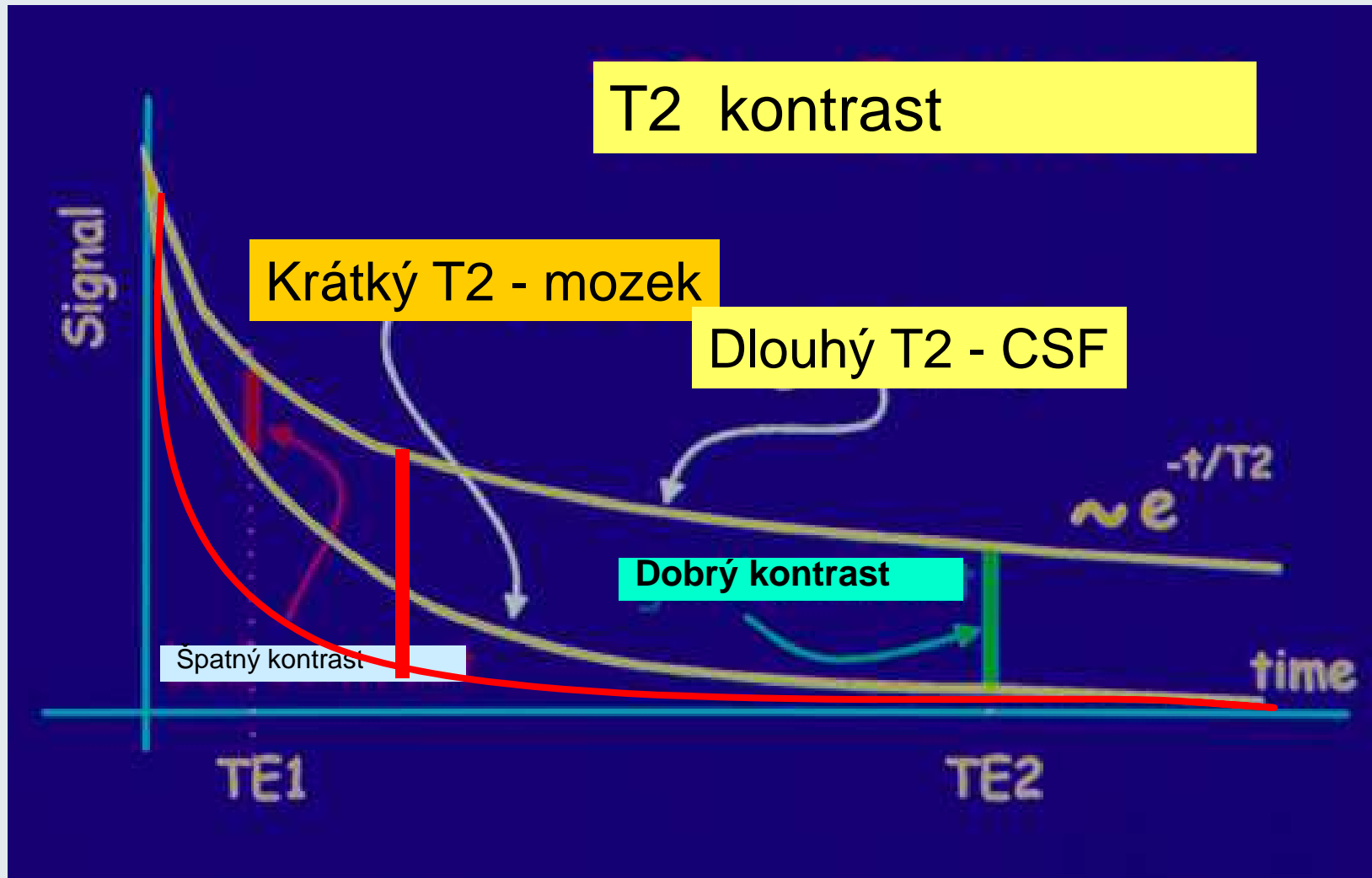


T2
↓

T1 vážený obraz



T2 vážený obraz



Relaxivita

$$R_{i(\text{obs})} = 1/T_{i(\text{obs})} = 1/T_{i(\text{diam})} + r_i C$$

↓
celková relaxivita

T_i před aplikací KL



molární relaxivita [$\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$]

$i=1$ nebo 2

Magnetické materiály pro konstrukci KL

Relativní magnetická susceptibilita χ_r

• Diamagnetické	-1
• Paramagnetické	+10
• Superparamagnetické	+5000
• Ferromagnetické	+25000

PM kontrastní látky

Zkrácení relaxačních časů paramagnetickými látkami
=> **vliv především na T1 kontrast, méně na T2 relaxaci**

Relaxivita závisí na:

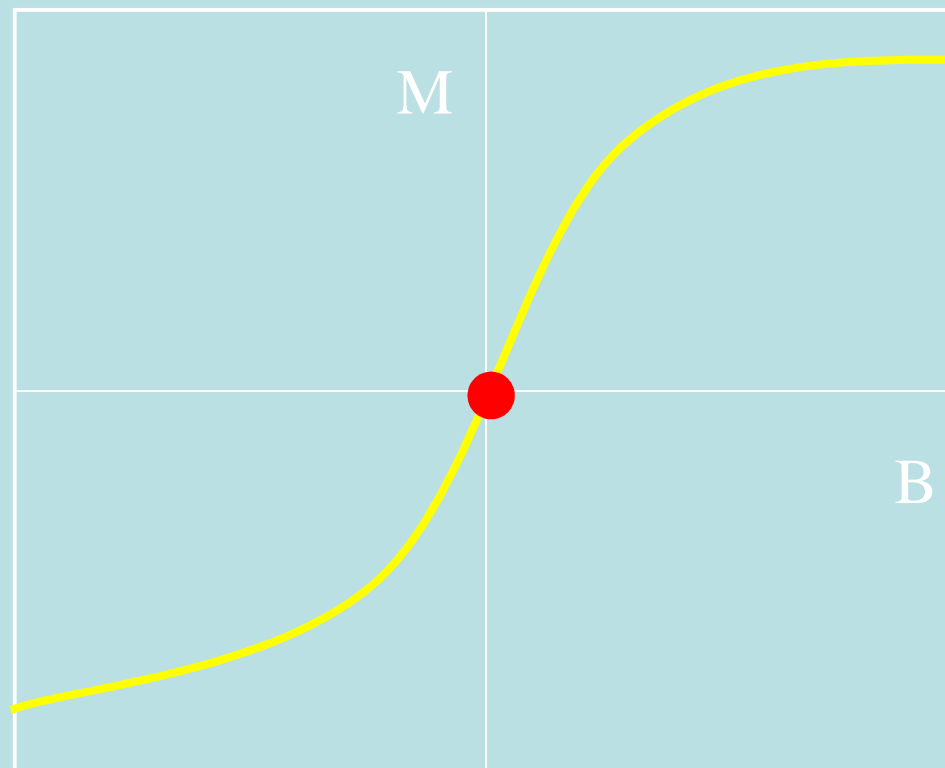
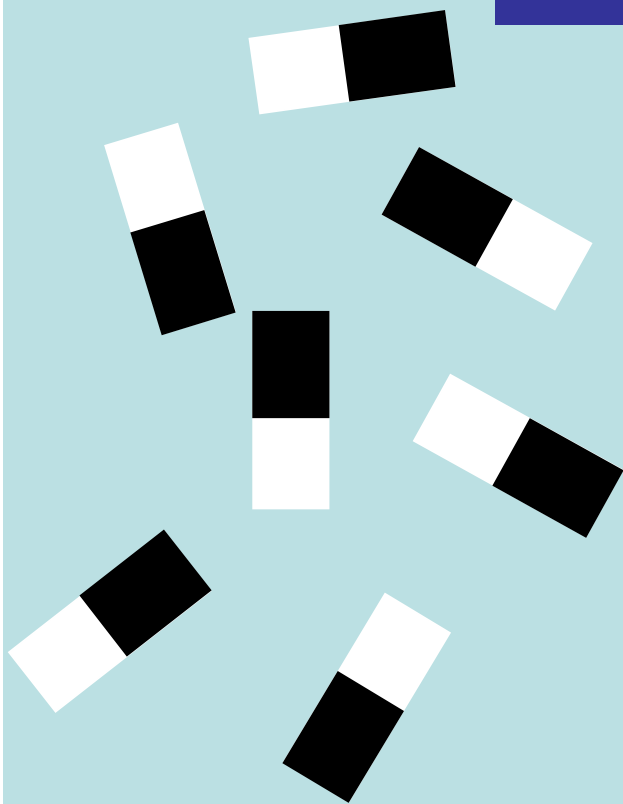
- koncentraci paramagnetických jader
- velikost magnetického momentu
- vzdálenosti protonu od daného jádra
- počtu stupňů volnosti (korelačních časů) – spinová relaxace elektronů, pohyb jádra, kontaktní době jádra a protonu

čím vyšší počet nepárových elektronů, tím vyšší relaxivita

Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

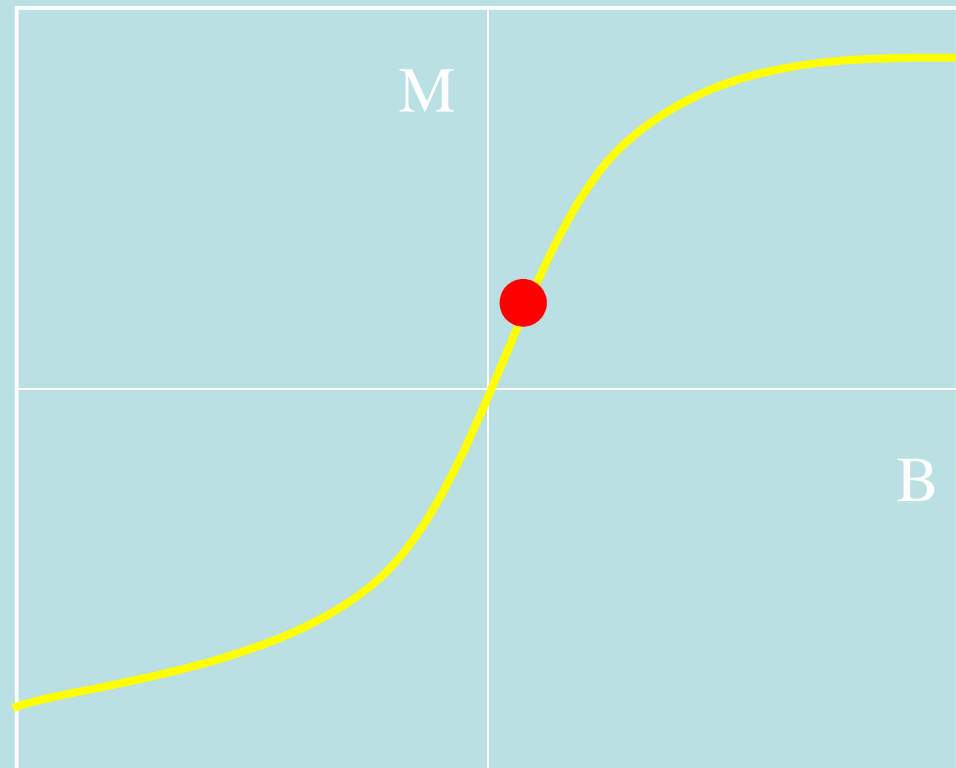
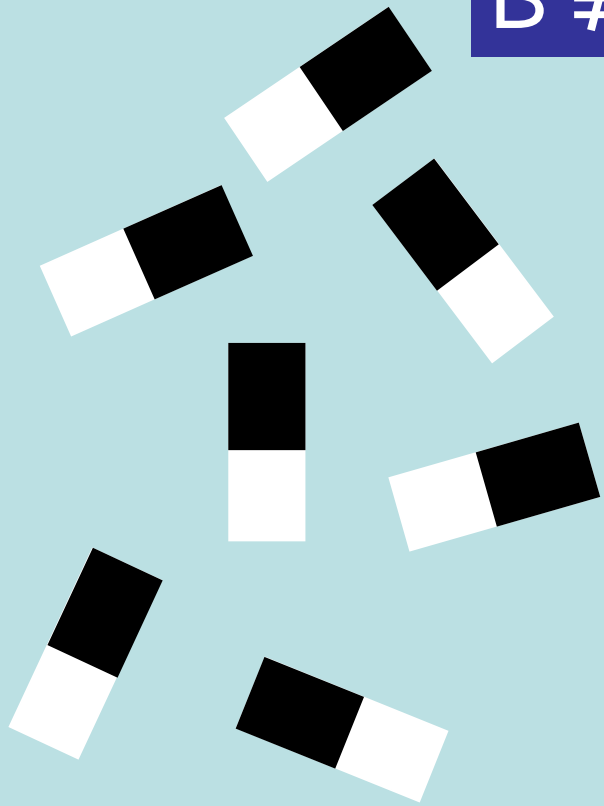
$$B = 0, M = 0$$



Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

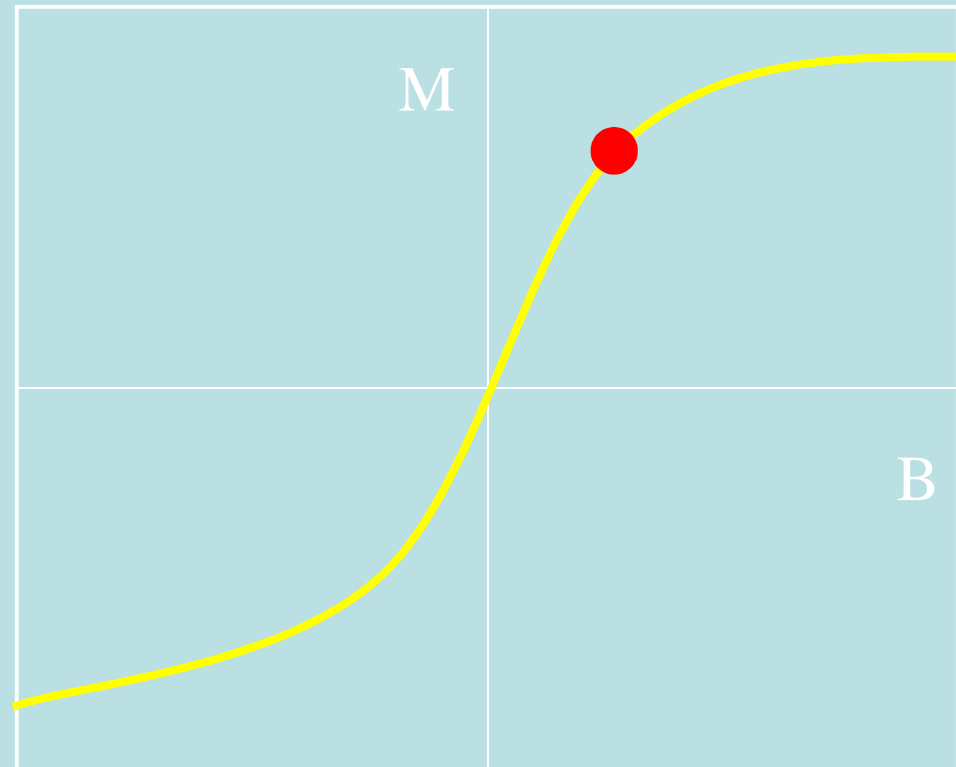
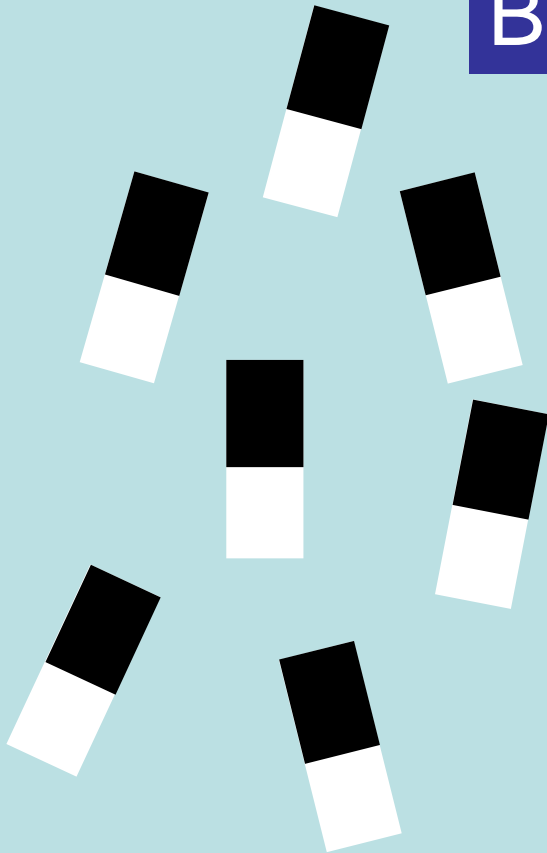
$$B \neq 0, M \neq 0$$



Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

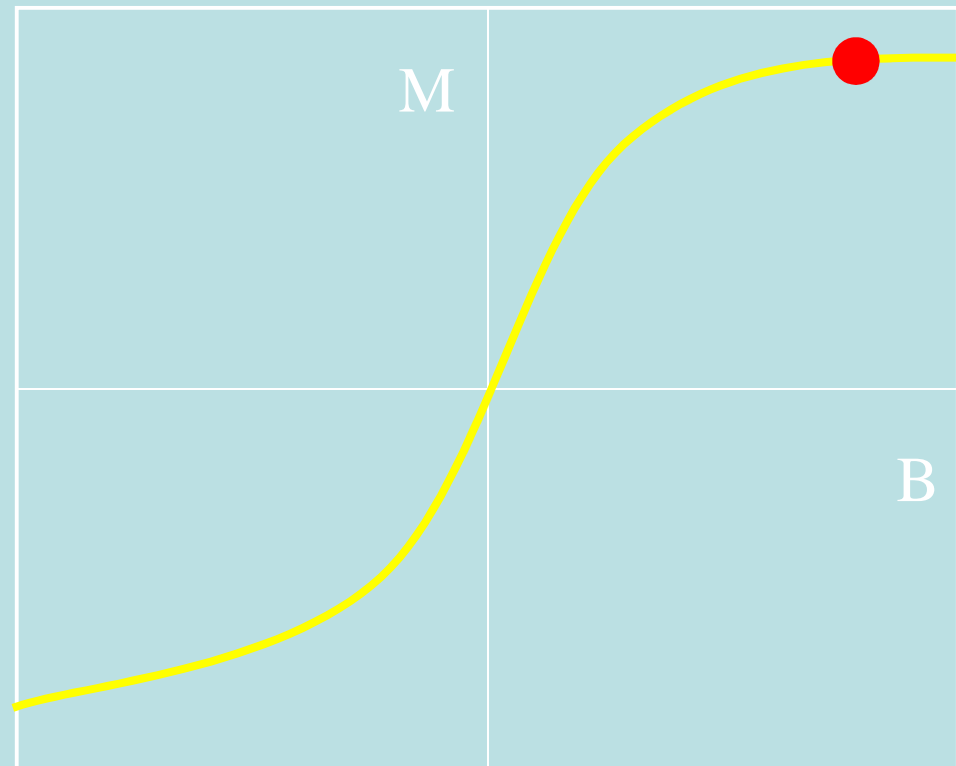
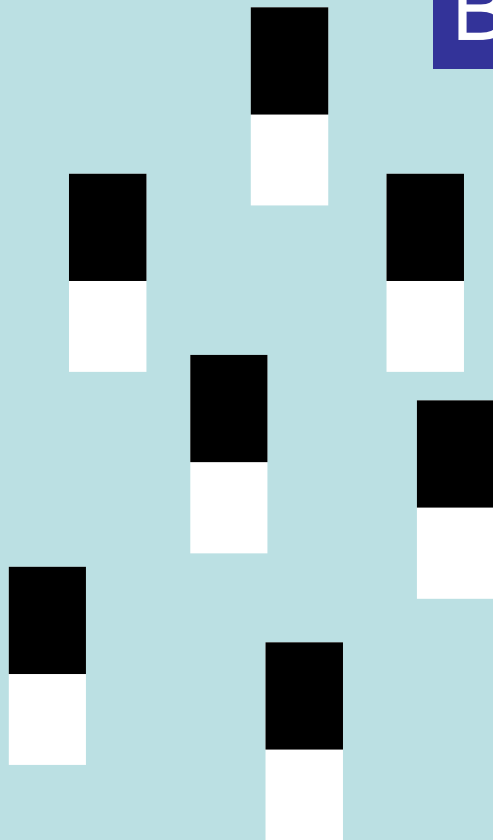
$$B \neq 0, M \neq 0$$



Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

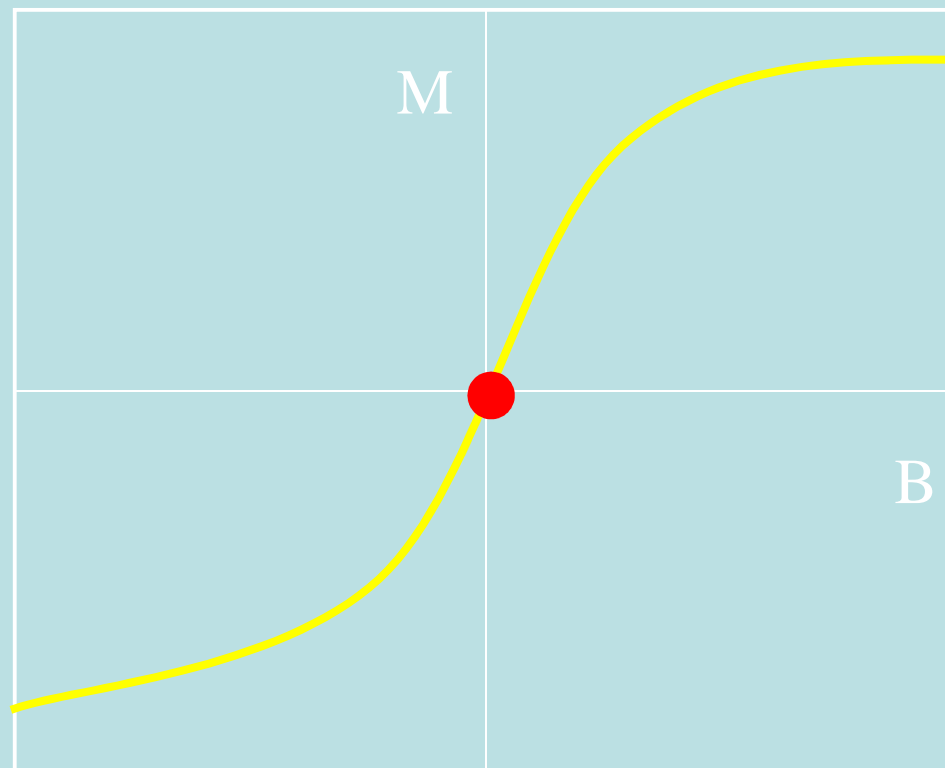
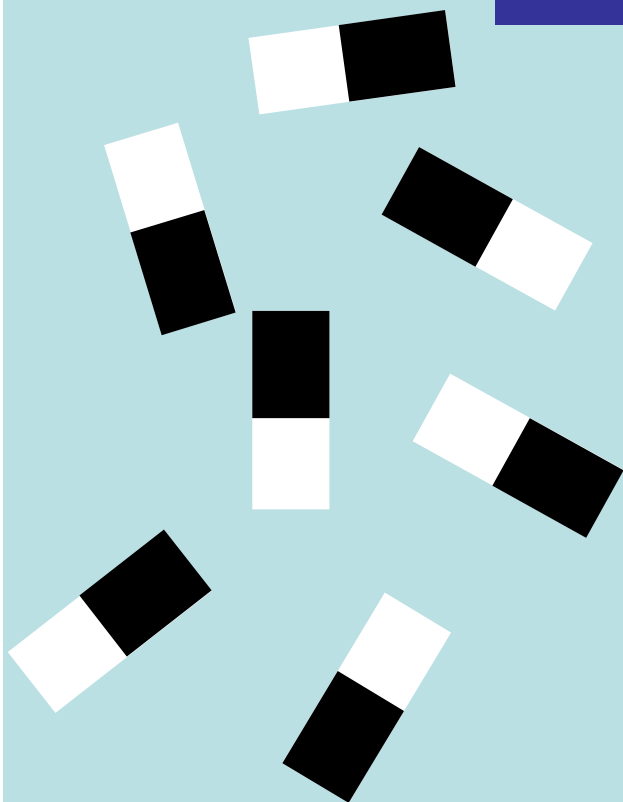
$$B \neq 0, M \neq 0$$



Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

$$B = 0, M = 0$$

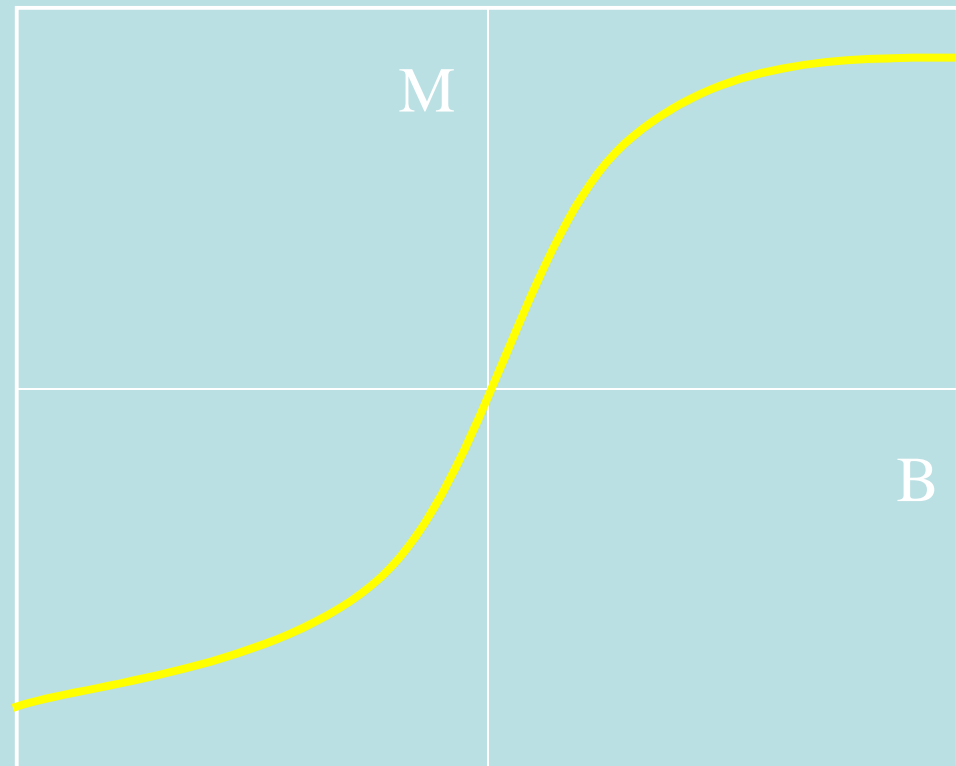


Fyzikální odbočka

Paramagnetismus

Ferromagnetismus

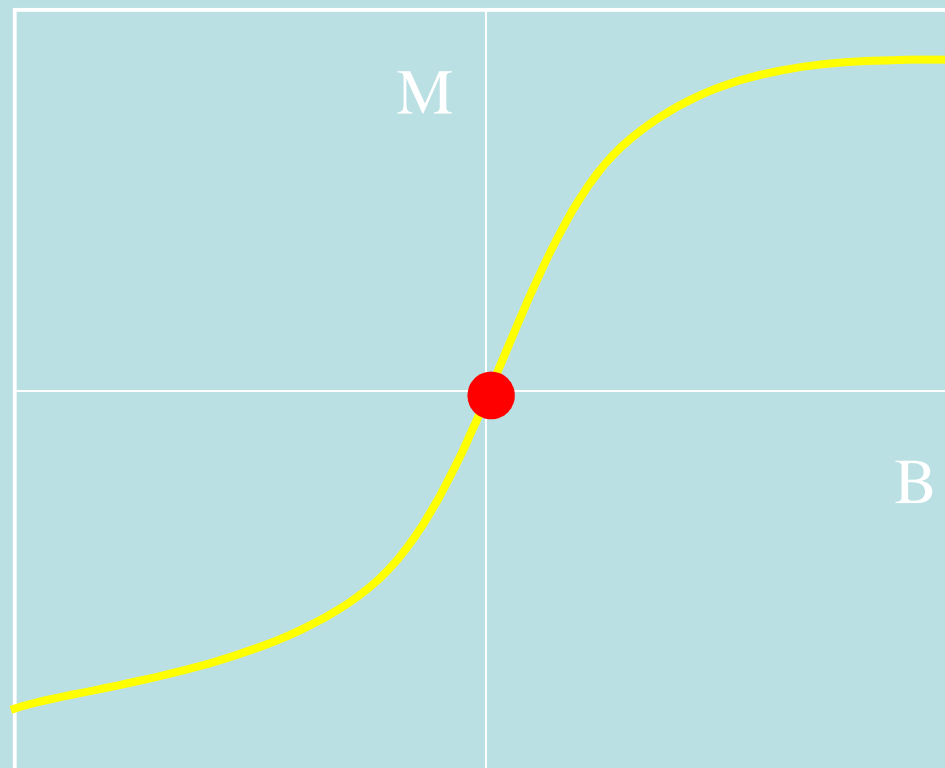
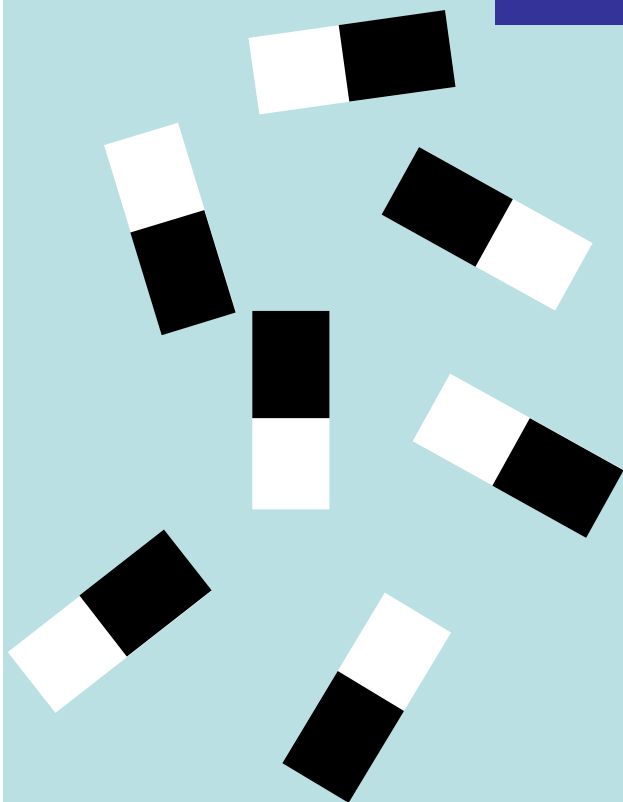
Superparamagnetismus



Fyzikální odbočka

Ferromagnetismus

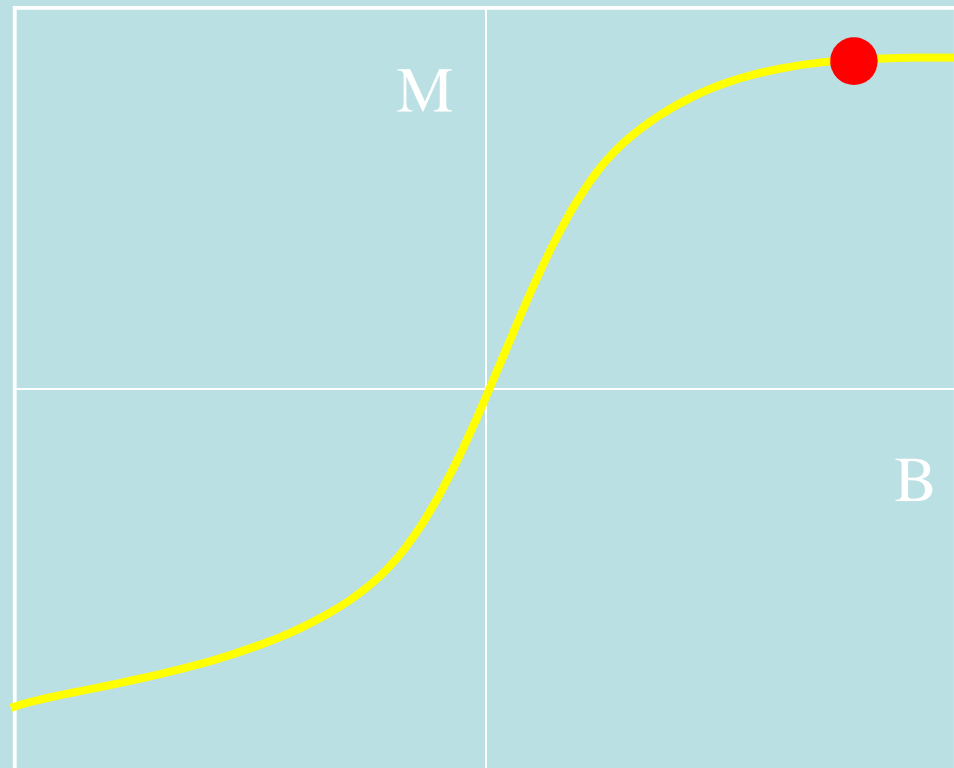
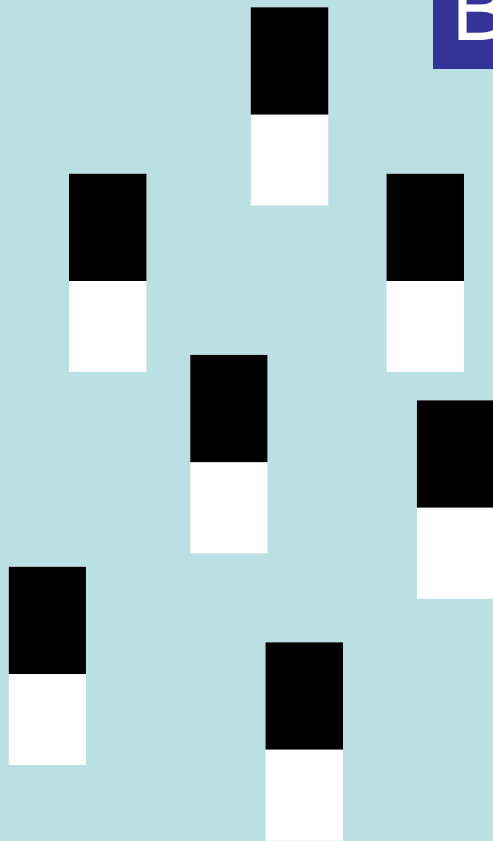
$$B = 0, M = 0$$



Fyzikální odbočka

Ferromagnetismus

$$B \neq 0, M \neq 0$$



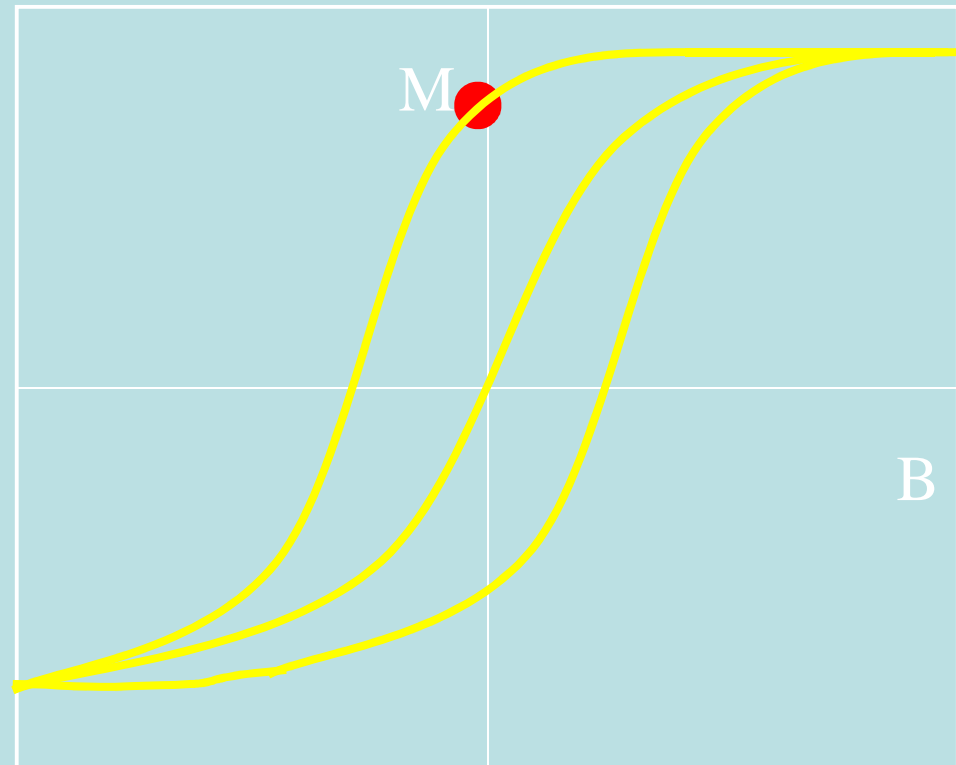
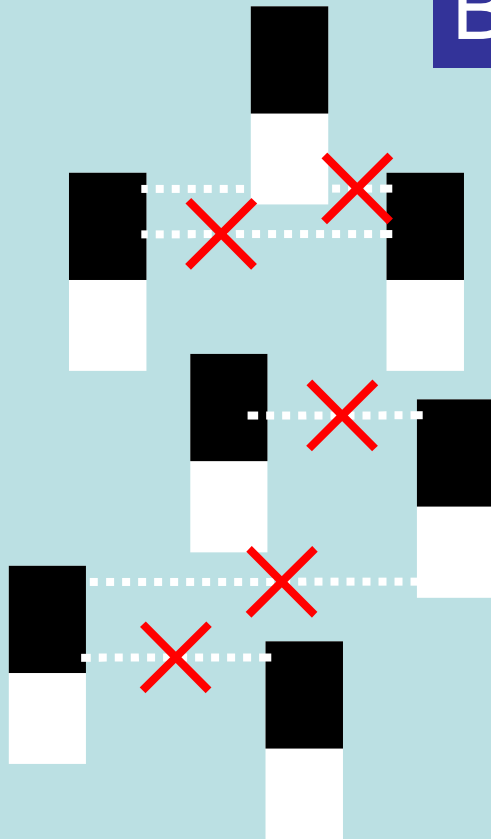
Fyzikální odbočka

Ferromagnetismus



přechází v paramagnetismus
za teploty vyšší než je
Currieova teplota materiálu

$$B = 0, M \neq 0$$



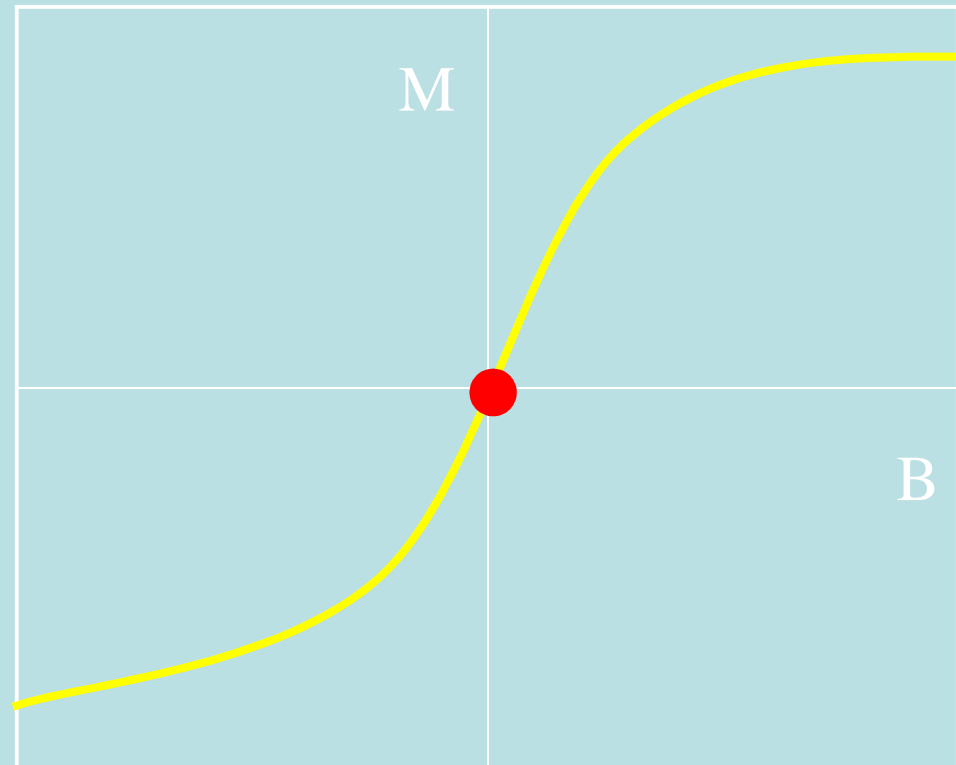
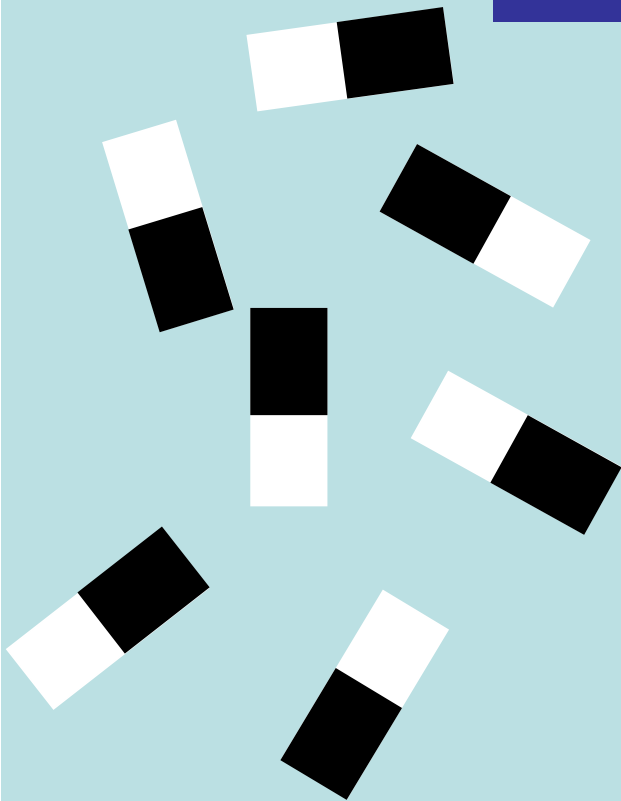
Fyzikální odbočka

Ferromagnetismus → přechází v paramagnetismus

za teploty vyšší než je

Currieova teplota materiálu

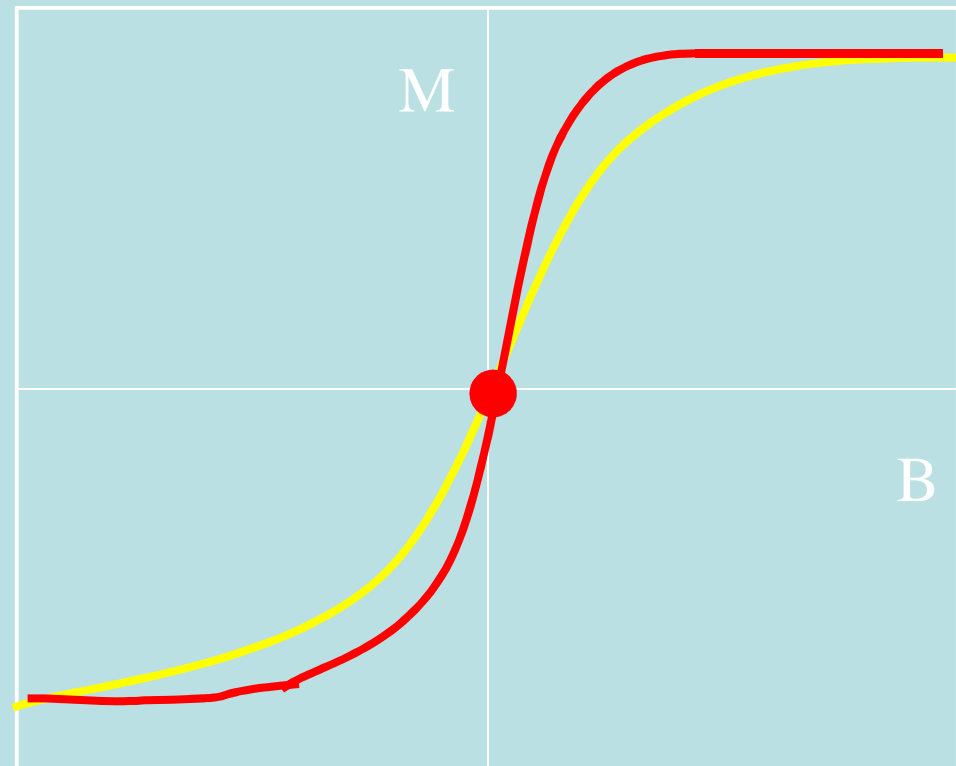
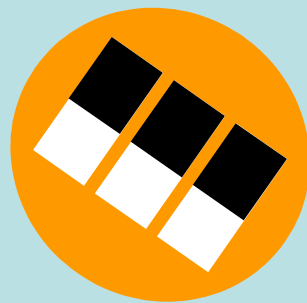
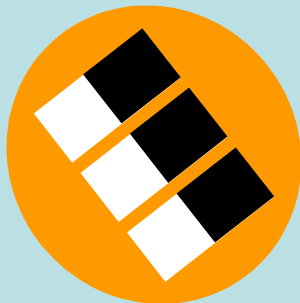
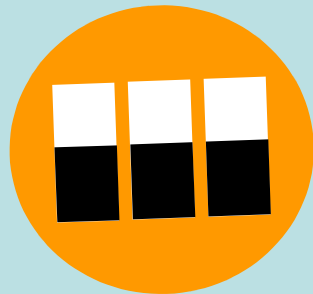
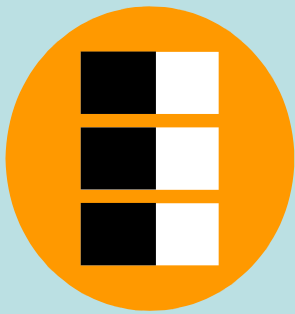
$$B = 0, M = 0$$



Fyzikální odbočka

Superparamagnetismus

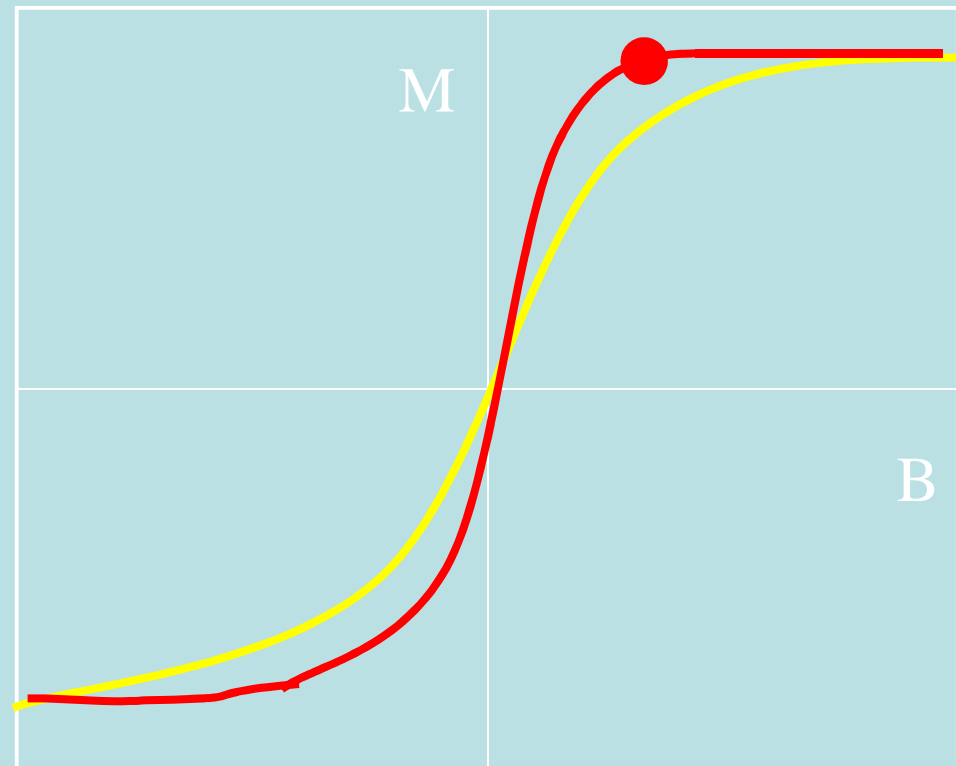
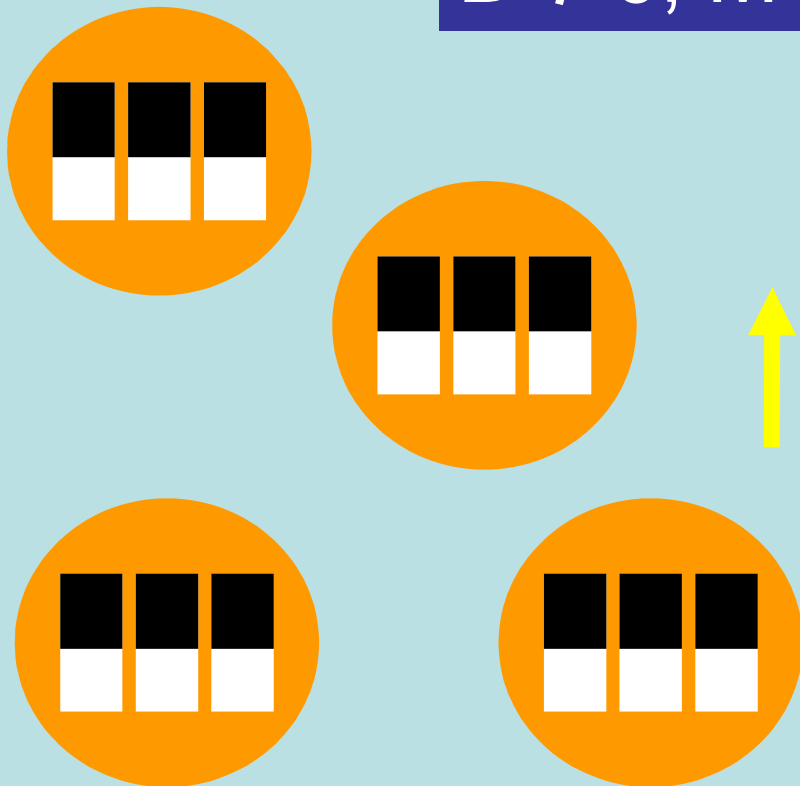
$$B = 0, M = 0$$



Fyzikální odbočka

Superparamagnetismus

$$B \neq 0, M \neq 0$$



Paramagnetické kontrastní látky (Pozitivní KL)

Silné paramagnetické látky:








Molekulární kyslík, oxidy dusíku

Volné radikály (pyrrolidine-N-oxyl,
pyperidin-N-oxyl radicals)

Kationy: Dy^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} ,
 Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mn^{3+} , Gd^{3+}








Paramagnetický ion - ^{64}Gd

Orbitaly

K	1s	
L	2s 2p	
M	3s 3p 3d	
N	4s 4p 4d 4f	
O	5s 5p 5d 5f	
P	6s 6p 6d	
Q	7s	

Paramagnetický ion - ^{25}Mn

Orbitaly

K	1s	
L	2s 2p	
M	3s 3p 3d	
N	4s 4p 4d 4f	
O	5s 5p 5d 5f	
P	6s 6p 6d	
Q	7s	

Relaxivita kontrastních látek

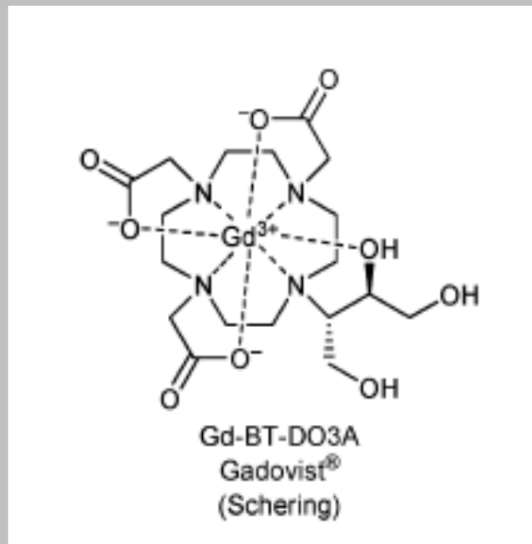
$$R = R1 + R2 = 1/T1 + 1/T2 \quad [\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

$$R2 > R1$$

	R1	R2
Gd ³⁺ cheláty	~ 4	~ 6
Ln ³⁺ , Fe ³⁺ macromol	> 10	> 10
Fe nanočástice	~ 20	~100

Pozitivní kontrastní látky cheláty Gd(3+)

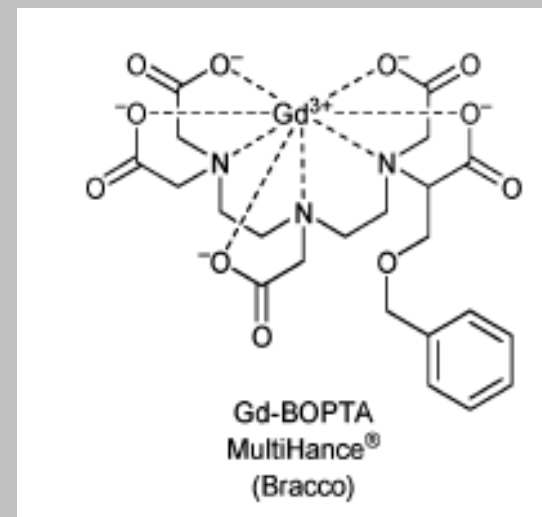
Macrocyclic non-ionic



Gadovist

$R_1 = 5.3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

Linear - ionic



MultiHance

$R_1 = 6.7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

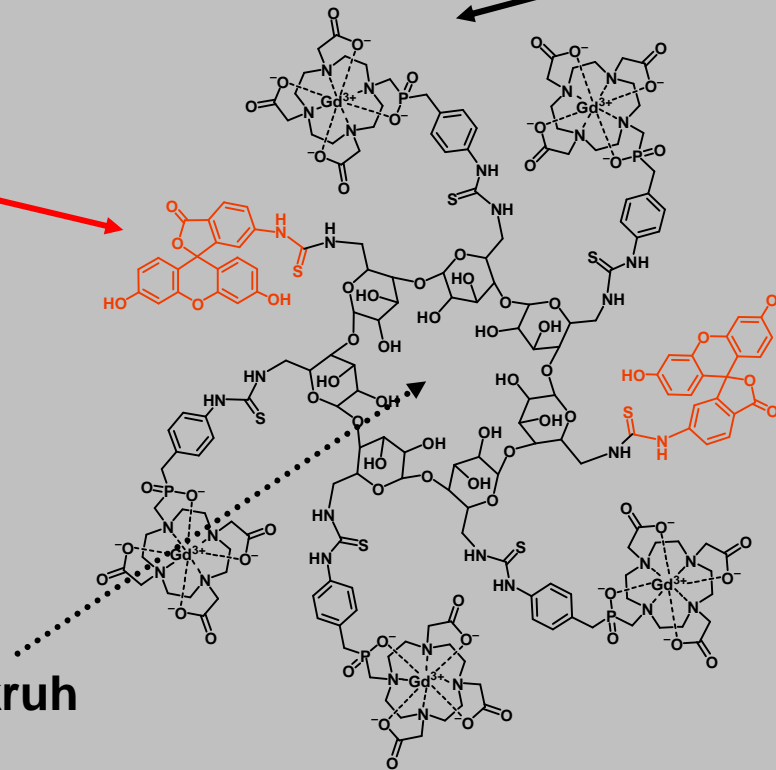
Pozitivní kontrastní látky bimodální KL

Bimodální kontrastní látka: $R2 \ 22s^{-1}mmol^{-1}$

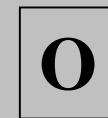
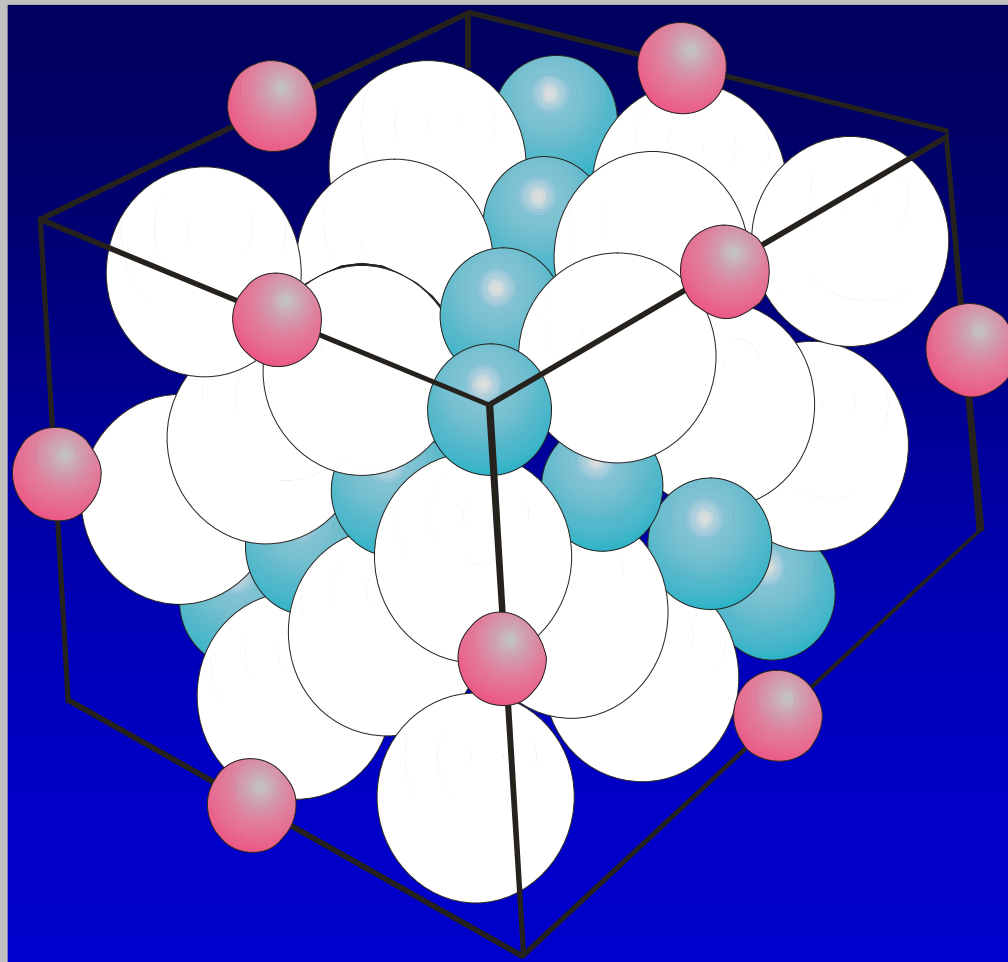
fluorescein

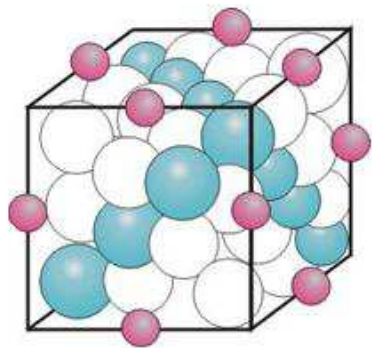
Gd komplexy

Betacyklodextrinový kruh

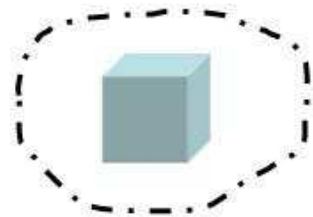
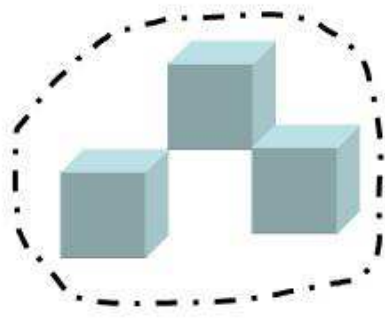


Superparamagnetické nanočástice Fe_3O_4

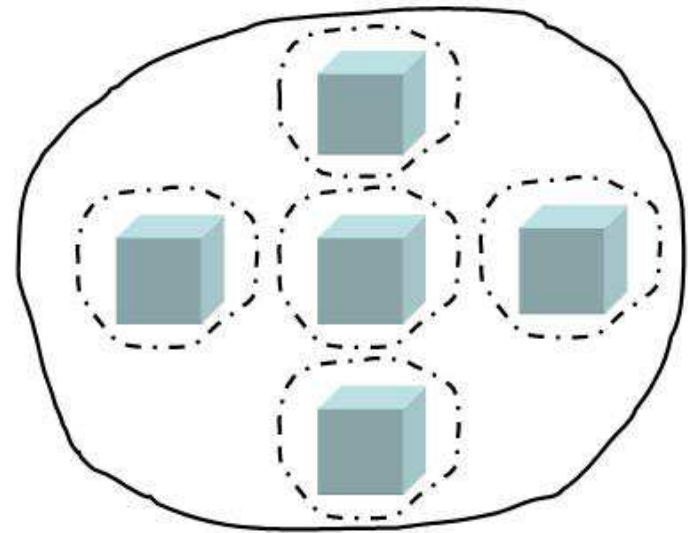
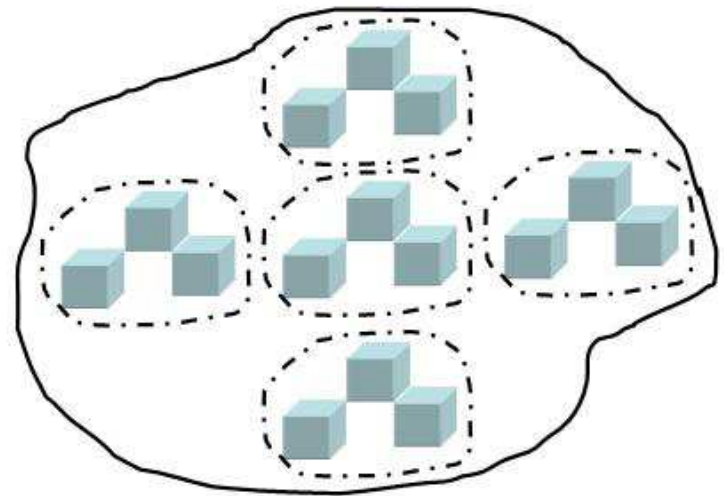




a

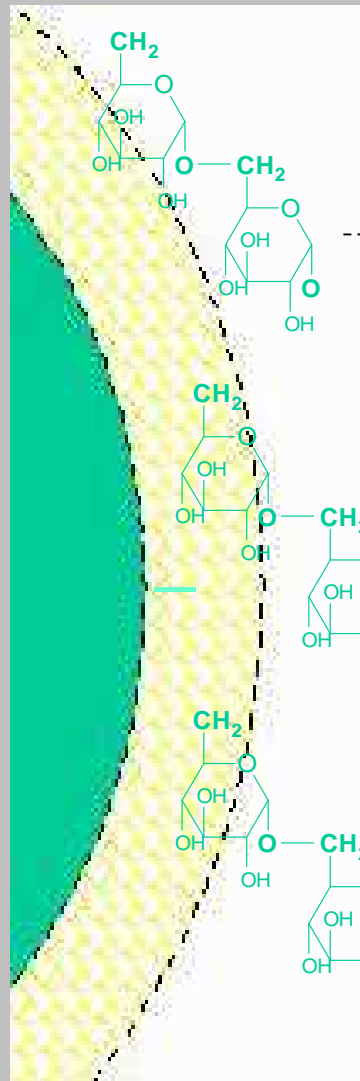


b



c

Konstrukce povrch nanočástic



Kovalentní vazba

electrostatická vazba

transfekce

**macromolekuly
albumin, poly-lysin, dendrimery, PEG...**

antibodies, antigens...

**Malé molekuly,
lipidy, léky**

Nanočástice pro buněčné zobrazování

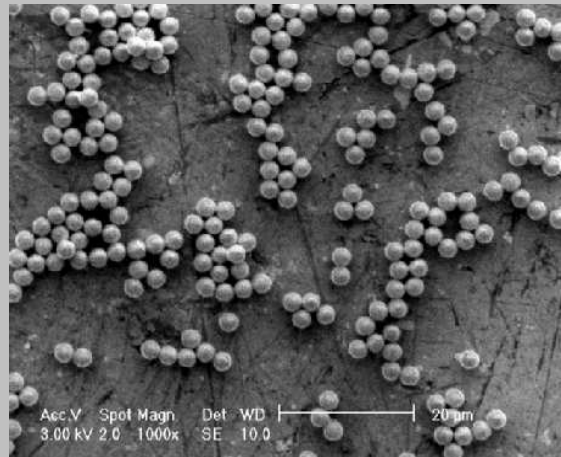
- **MPIO**
- **Micro-superparamagnetické oxidy Fe**
Lumiren, Gastroscan, Gastromark, **Dynabeads**
- **SPIO**
- **superparamagnetické oxidy Fe (Endorem, Resovist)**
- **USPIO**
- **ultrasmall SPIO**
Sinerem, Combidex, Clariscan, MION

≈ 1000 nm

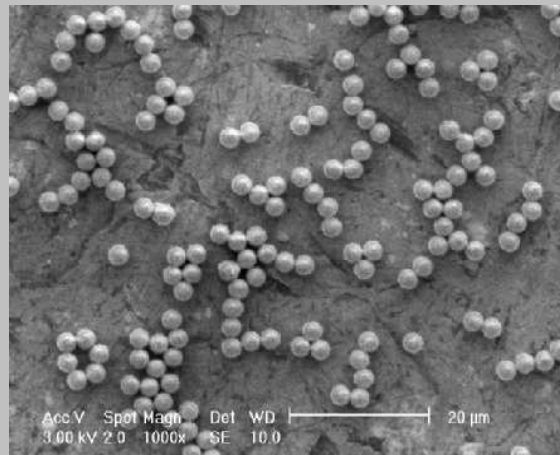
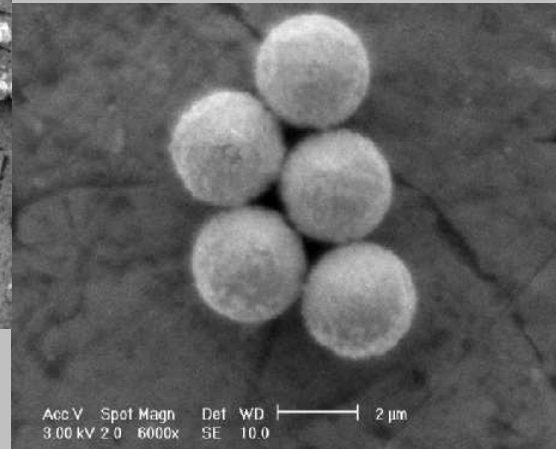
≈ 60 – 120 nm

≈ 20 – 40 nm

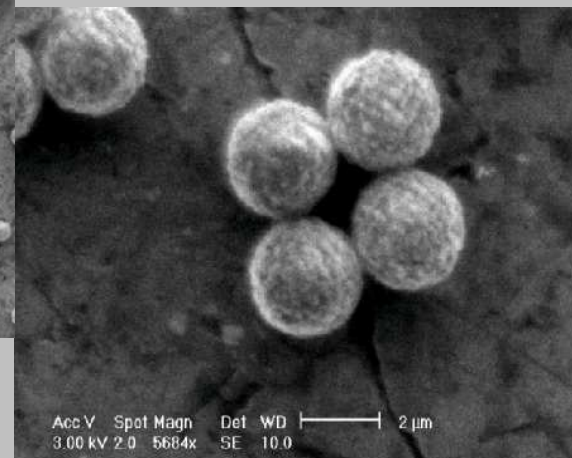
Dynabeads M-280 (2.8 μ m)



Částice bez obalu



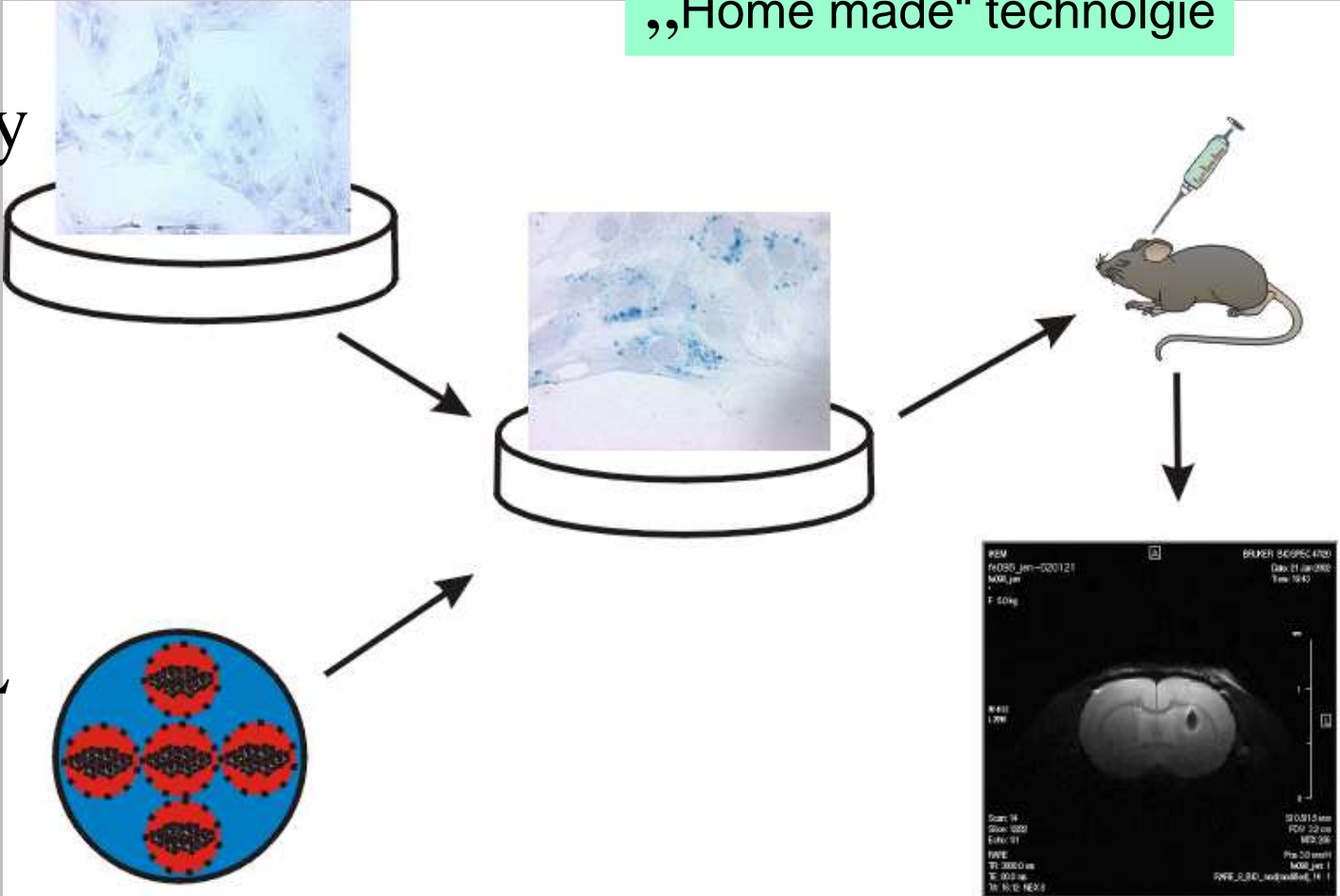
Částice obalené protilátkou



Příprava a použití buněčných KL

„Home made“ technologie

buňky



KL

MR zobrazení buněčného transportu při 4.7 T

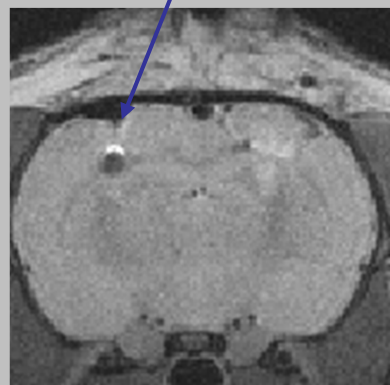
léze

transplanované buňky

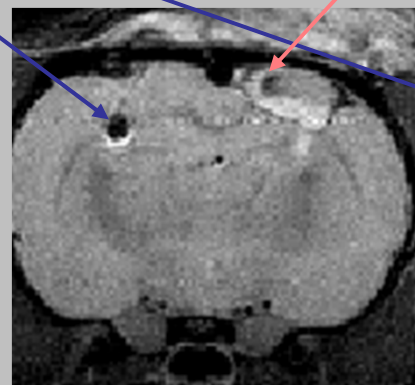
„putující“ buňky



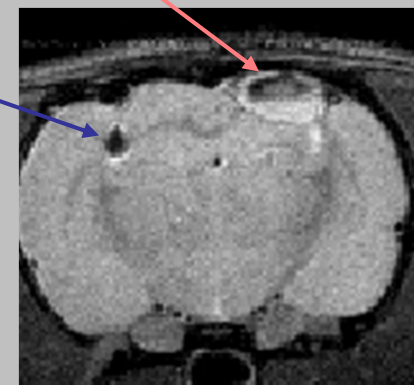
day: -1



day: 0



day: +33

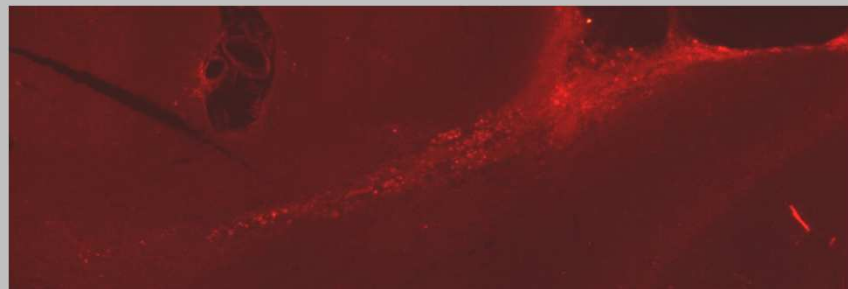


day: +45

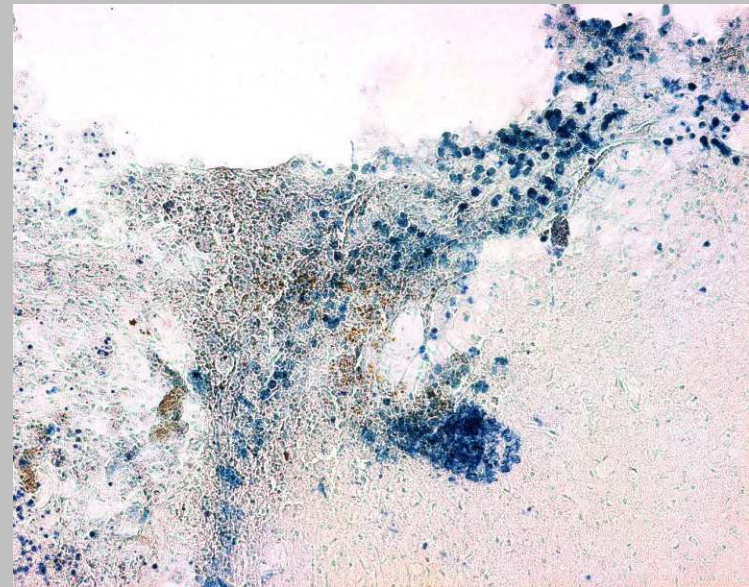
Mozek – MR - Histologie



mikro MR



Fluorescence BrDU diaminobenzidin



Fe-Berlínská modř

Superparamagnetické kontrastní látky

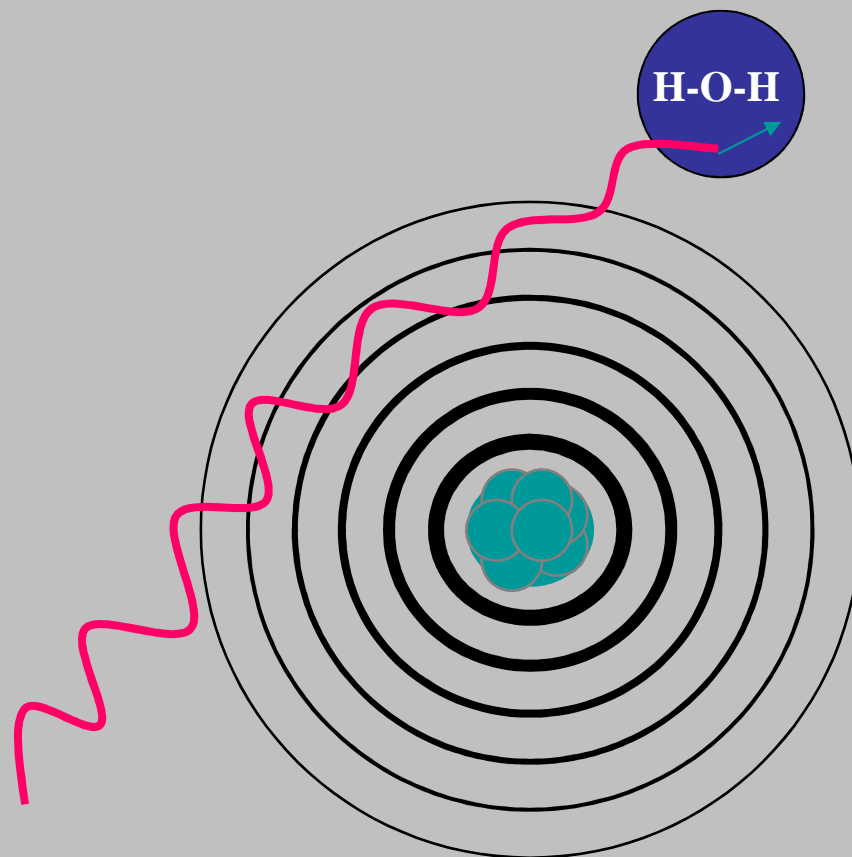
negativní KL

Materiál s velkou magnetickou susceptibilitou

- ➔ Místní nehomogenity magnetického pole („homogeneity spoilers“)
- ➔ Defázování protonů v blízkosti magnetického jádra
- ➔ **silný T2 efekt**

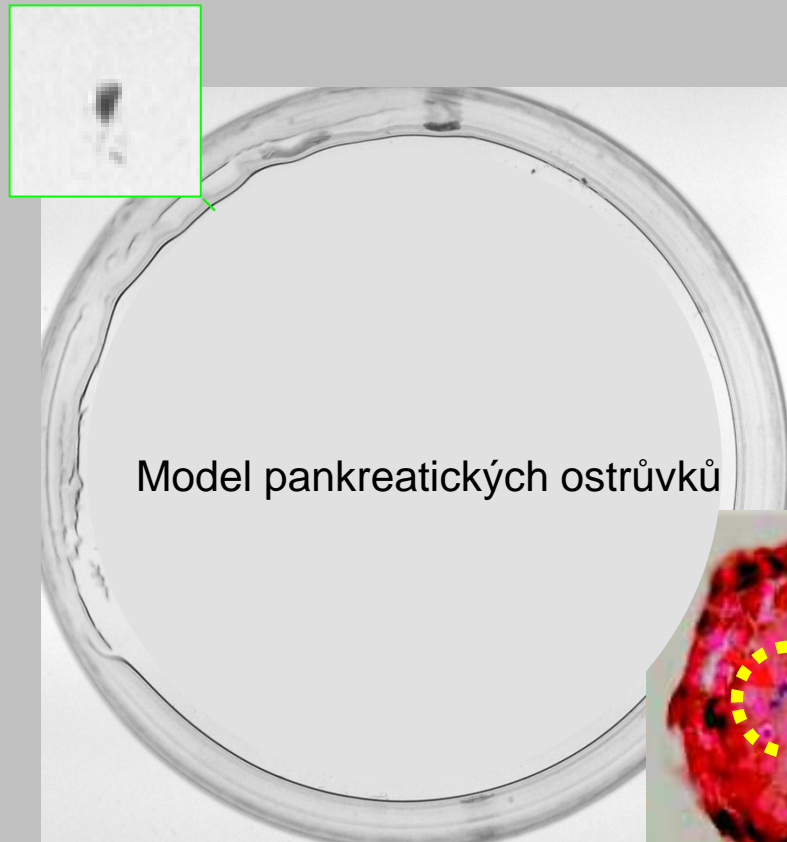
Superparamagnetické efekty

Fluktuace B_{loc}



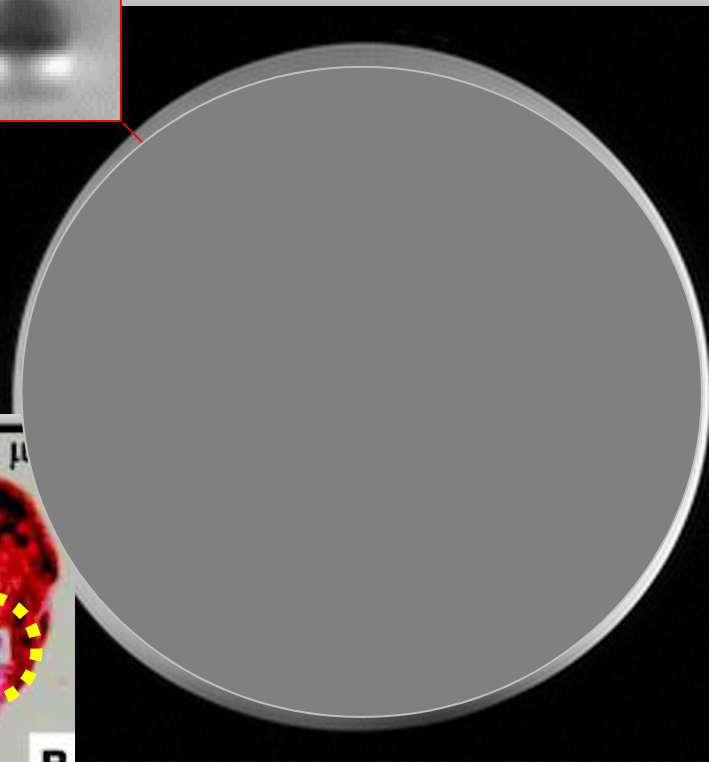
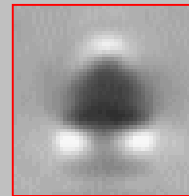
MR molekulární zobrazování

efekt superparamagnetické KL

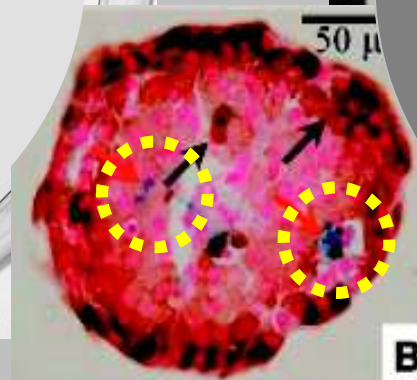


Macro photography

20 pixels

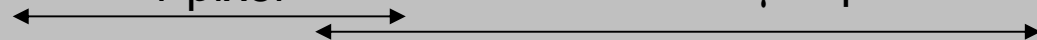


MR imaging



1 pixel

35mm \Rightarrow 137 μm/pixel



Theranostika = **terapie** + **diagnostika**

(*therapeutics* and *diagnostics*)

Kombinace diagnostických a léčebných postupů
pro jednotlivá onemocnění (a pacienty)

Nanočástice pro molekulární a buněčné zobrazování

Nosič: buňky s terapeutickým efektem – např. beta buňky

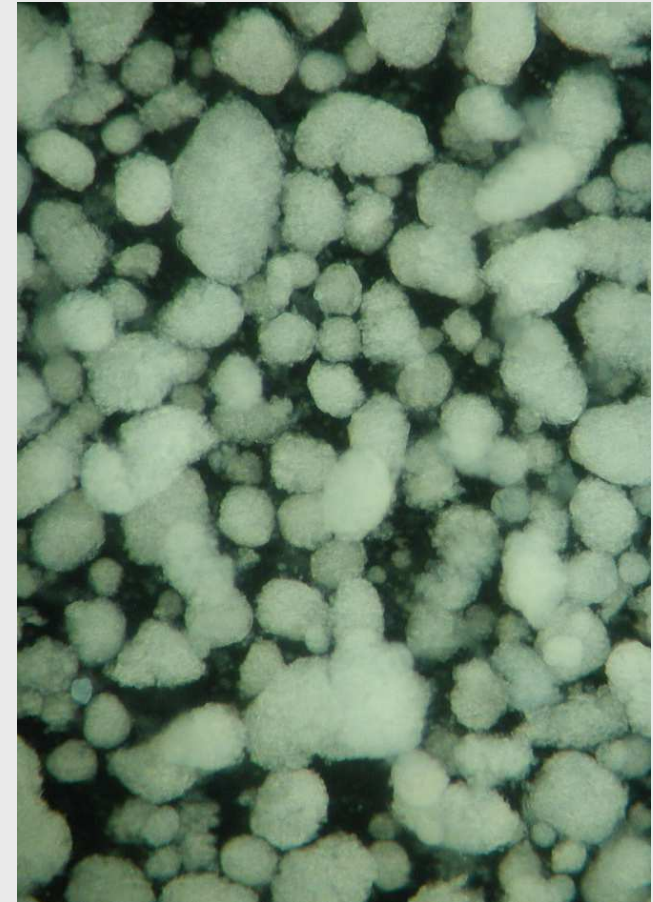
radioaktivní ionty s krátkým poločasem
rozpadu pro selektivní ozařování

léky s terapeutickým účinkem

částice pro termální ablaci

Pankreatické ostrůvky - úvod

- Typ 1 diabetes mellitus (DM 1) je charakterizován autoimunním rozpadem beta buněk v pankreatických ostrůvcích a následnou inzulínovou deficiencí
- Transplantace pankreatických (Langerhansenových) ostrůvků do jater je specifickou a slibnou léčbou DM1 onemocnění



Isolated rat pancreatic islets

Insulin production

Pankreatické ostrůvky

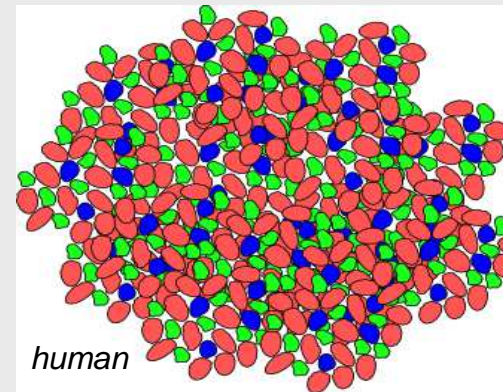
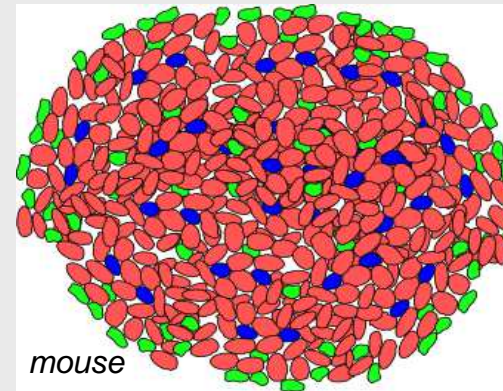
β cells (65-85%)
insulin

α cells (10-15%)
glucagon

δ cells (3-10%)
somatostatin

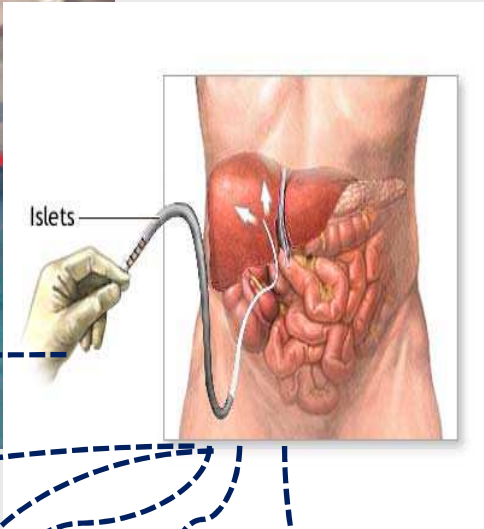
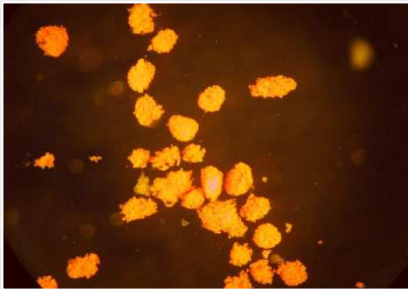
PP cells 1%
 ϵ -cells

macrofágy



0.05 – 0.45 mm

Transplantace pankreatických ostrůvků



IBMIR

Porušená revascularizace

Záněty

Rejekce

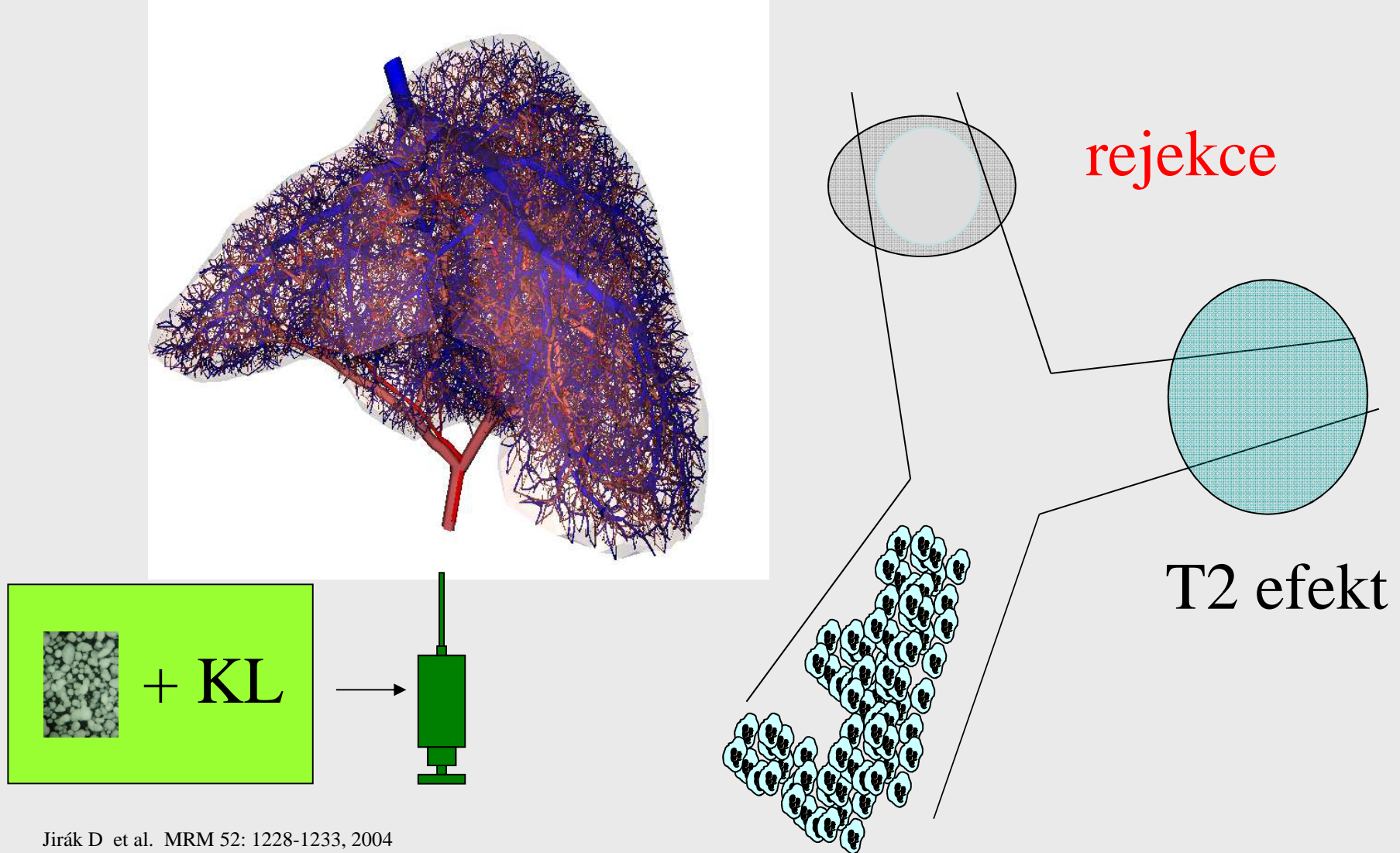
Ischemie

Autoimunita

Toxicita

Transplantace pankreatických ostrůvků

model použití buněčných kontrastních látek



Jiráček D et al. MRM 52: 1228-1233, 2004

Kříž J et al. Transplantation 80: 1596-1603, 2005

MRI označených pankreatických ostrůvků

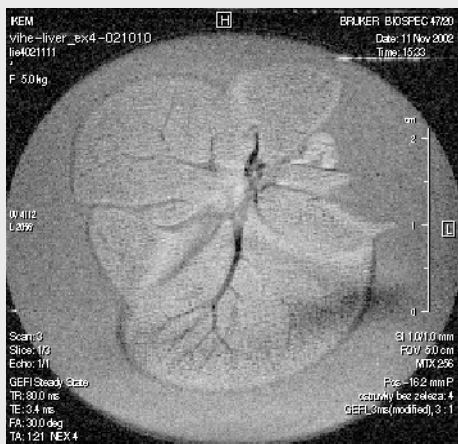
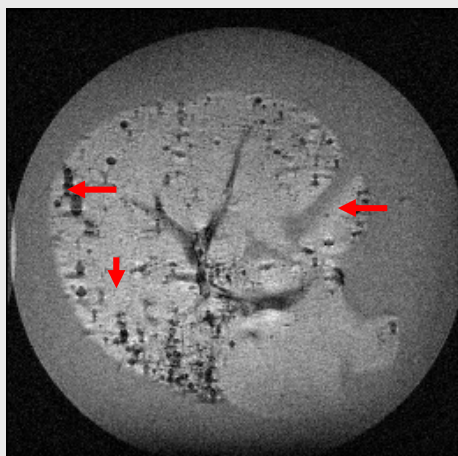
Počet buněk

Poloha buněk

Záněty

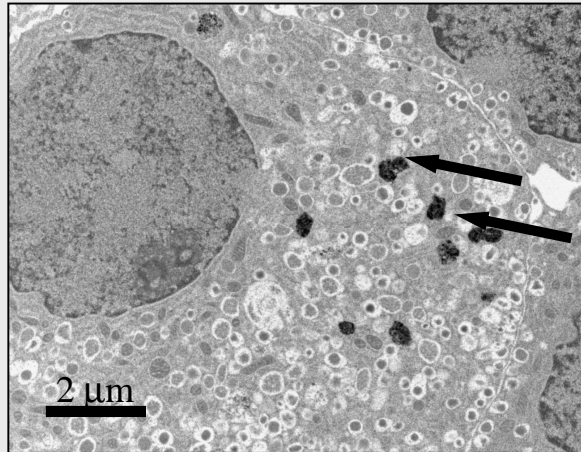
Rejekce

Ostatní komplikace

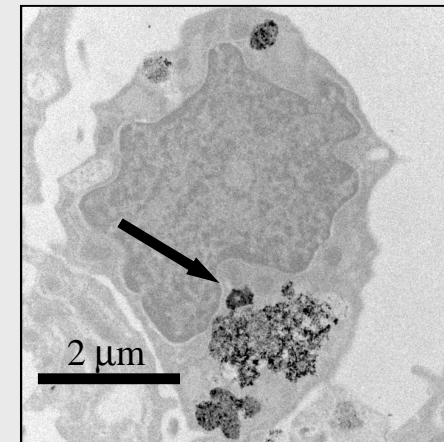


Transmisní Elektronová Mikroskopie

beta-buňky

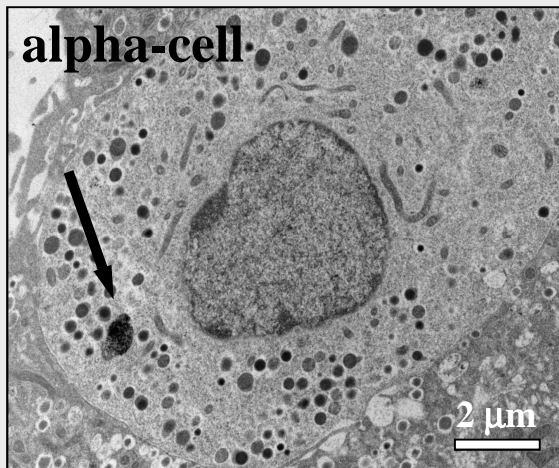


makrofágy

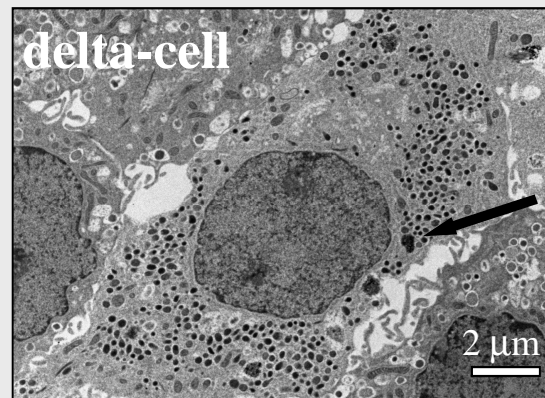


PI buňky po 24 hodinách
kultivace s Resovistem

alpha-cell



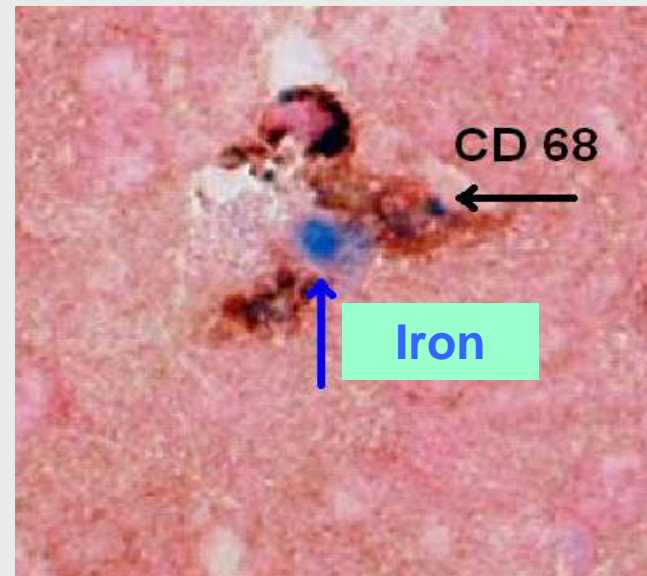
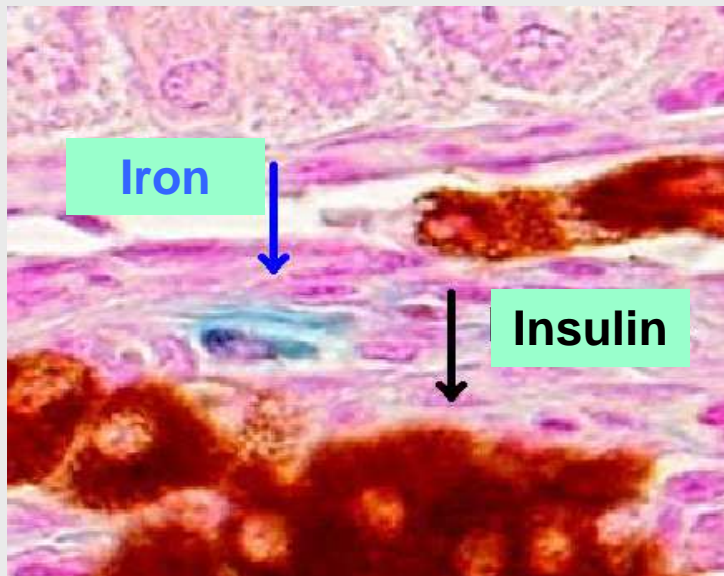
delta-cell



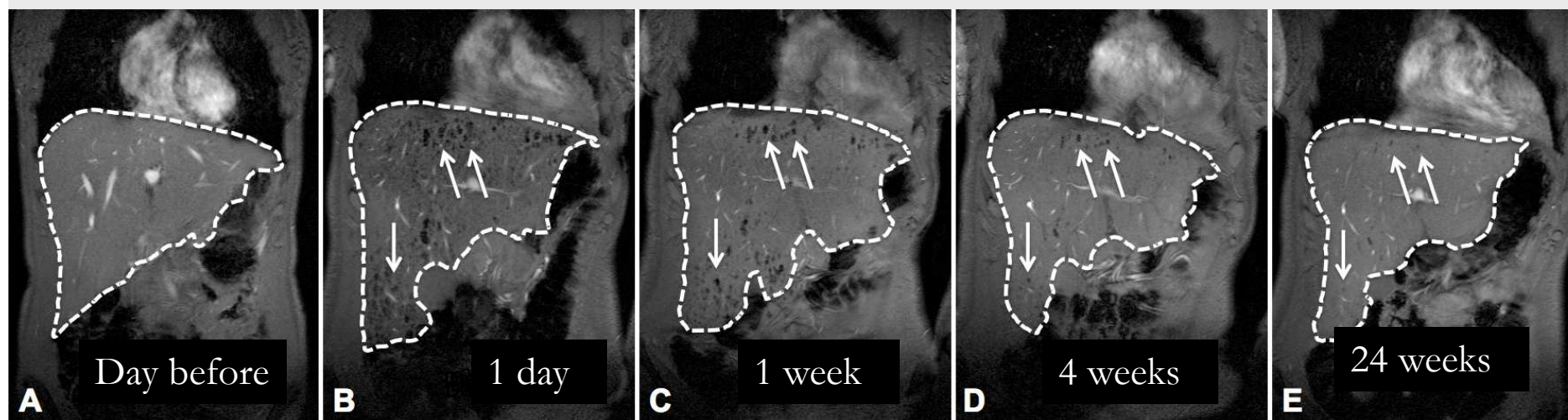
Histologie

PI+Resovist[®] - po transplantaci do jater potkana;

barvení: Prussian modř, insulin and anti-ED1 (CD 68)



Monitorování přežívání lidských transplantovaných PI



C-Peptide: 0	0.45	0.37	0.28	0.37 nmol/L
Insulin: 40		20	18	12 IU/day

481 000 islet equivalents, 385 000 islets, approx. 80 % purity, 40 hours labeling

Závěry

Výsledky experimentálních a klinických studií jsou podobné

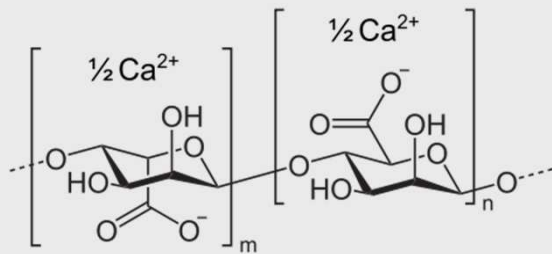
Pankreatické ostrůvky jsou ideálním modelem pro buněčné zobrazování a theranostiku



Mikro-kapsle pro PI

Arifin DR... Radiology. 2011 Sep;260(3):790-8.

Alginate – seaweed extract

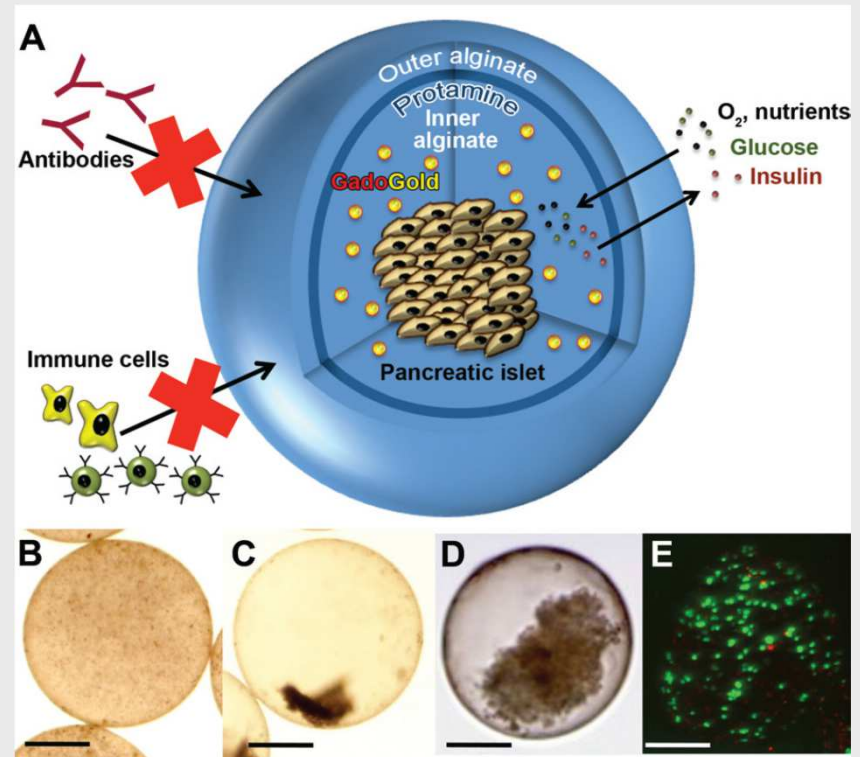


A, Three-dimensional scheme of APSA microcapsule containing GG (APSA 1 GG).

B, C, Light microscopic images of APSA 1 GG microcapsule 1 hour (*B*) and 2 days (*C*) after synthesis.

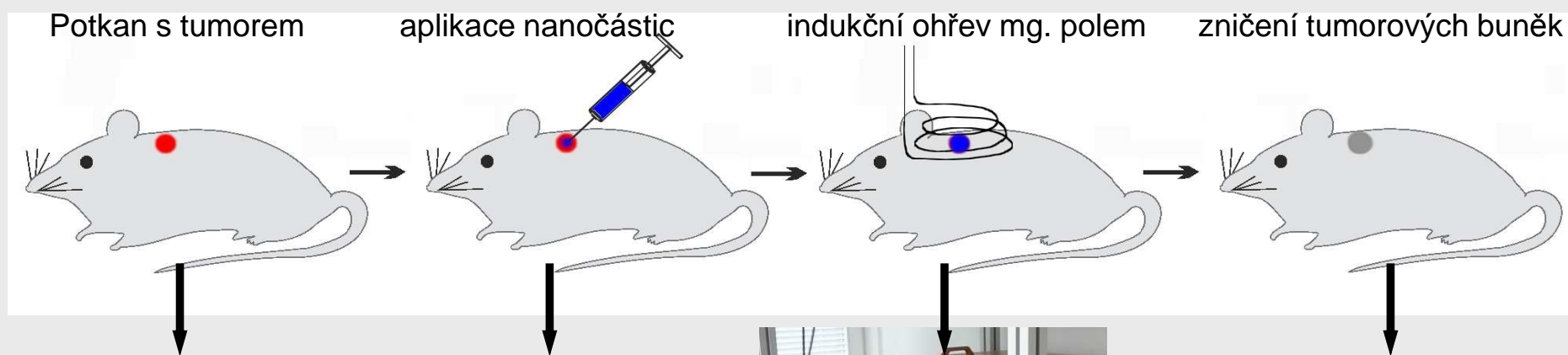
***D*, Human pancreatic islet inside APSA 1 GG microcapsule.**

E, Fluorescence microscopic image shows viability staining of mouse

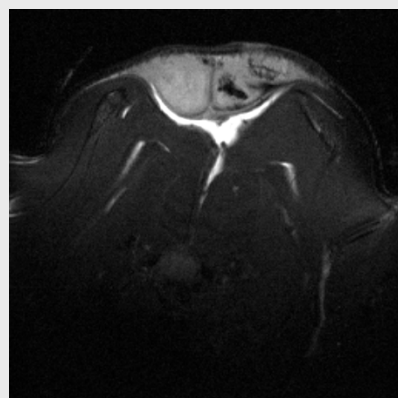


Termo-ablace pomoci nanočástic

Ferromagnetické částice lze použít jako kontrastní látku pro diagnostiku i pro kontrolované zničení buněk tumoru ohřevem magnetickým polem



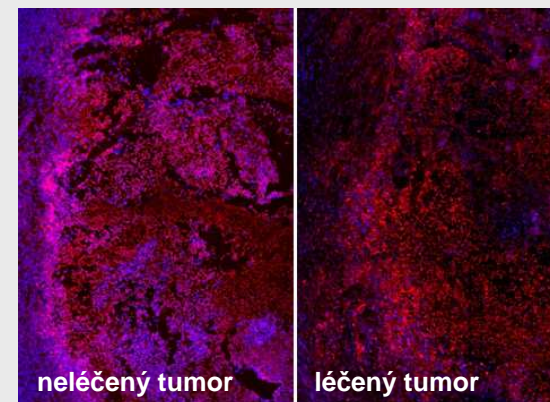
Zobrazení pomocí MRI před aplikací kontrastní látky



Zobrazení pomocí MRI po aplikaci kontrastní látky



Kontrolovaný ohřev tumoru magnetickým polem



Histologické ověření apoptózy (buněčné smrti) v tumoru

A photograph of a modern building at sunset. The sky is filled with colorful clouds in shades of orange, yellow, and blue. The building is a multi-story structure with many windows. A large, 3D, white text overlay with a blue shadow is positioned at the top of the image, reading "Děkuji za pozornost".

Děkuji za pozornost

Děkuji kolegům za poskytnutí materiálů:

D. Wagnerová, M. Dezortová, F. Jírů, A. Škoch, V. Herynek, P. Jendelová, J. Tintěra, I. Ibrahim, D. Vedlich, D. Kautznerová, A. Malucelli, A. Zolal, M. Sameš, M. Syruček, D. Urgošík, J. Vymazal, P. Kršek, P. Marusič, M. Krššák, I. Tkáč, B. Gückel, U. Klose

IKEM Praha; Nemocnice Na Homolce; MN Ústí nad Labem; MR Center of Excellence, Medical University Vienna; KE University Tuebingen.