

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Optimalizace značení kmenových a fibroblastických buněk
superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa**

Autor:	Bc. Mary Kolářová
Vedoucí diplomové práce:	Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.
Studijní obor:	Nanotechnologie
Forma studia:	Prezenční
Rok:	2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Mary Kolářová

Název práce: Optimalizace značení kmenových a fibroblastických buněk superparamagnetickými nanočásticemi oxidů železa

Typ práce: Magisterská

Pracoviště: Katedra experimentální fyziky

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Počet stran: 88

Jazyk: čeština

Abstrakt:

V předkládané diplomové práci je popisována problematika kmenových buněk ve spojení s nanotechnologickými postupy, které by v budoucnu mohly přispět ke klinické aplikaci v diagnostice molekulárního zobrazování, transportu léčiv či při cílené terapii. Práce obsahuje teoretický úvod zabývající se popisem kmenových buněk, jejich funkcí a propojení s oblastí nanotechnologie. Konkrétně popisuje superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO) a jejich charakterizaci pomocí fyzikálně-chemických technik. Dále je práce zaměřena na metody značení buněk SPIO nanočásticemi, především použitím ultrazvuku (tzv. sonoporace). Experimentální část práce se zabývá optimalizací parametrů ultrazvuku při značení buněk (kmenových, popř. fibroblastů) SPIO nanočásticemi, sleduje se vliv ultrazvuku na viabilitu, proliferaci a morfologické změny buněk po sonoporaci. Porovnává se efektivita značení sonoporací se standardní inkubací pomocí kvalitativní metody (barvení pruskou modří) a kvantitativního stanovení množství železa (metoda AAS - atomová absorpční spektroskopie). Na závěr je ověřen kontrast magneticky značených buněk na klinickém přístroji magnetické rezonance (MRI). Výsledky práce potvrzují zvýšenou účinnost značení buněk SPIO nanočásticemi použitím sonoporace.

Klíčová slova: superparamagnetické nanočástice oxidů železa (SPIO), kmenové buňky, sonoporace, MRI

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Mary Kolářová

Title: Optimization of labeling process of stem cells and fibroblasts by superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Type of thesis: Master

Department: Department of Experimental Physics

Supervisor: Mgr. Kateřina Poláková, Ph.D.

Year of presentation: 2013

Number of pages: 88

Language: Czech

Abstract:

This thesis describes the issue of stem cells associated with nanotechnology processes, which may contribute to the clinical application of molecular imaging in the diagnosis, drugs delivery and targeted therapies in the future. The work includes theoretical introduction presenting the importance of stem cells, their functions and connections with nanotechnology, describes superparamagnetic nanoparticles (SPIO) and physico-chemical techniques for their characterization. The experimental part is focused on the optimization of parameters of ultrasound during the labeling of cells (stem cells, fibroblasts) by SPIO nanoparticles. The impact of sonoporation on the studied cells is monitored by in-vitro cytotoxic methods such as measuring of viability and proliferation or monitoring of morphological changes of labeled cells. We also compare the efficiency of sonoporation technique with the standard incubation by either qualitative method (Prussian blue staining) or by quantitative determination of Fe concentration per cell (AAS-Atomic Absorption Spectroscopy). The final MRI (Magnetic Resonance Imaging) phantom experiments verified the negative contrast of the SPIO labeled cells. The results confirmed the enhanced uptake efficiency of the sonoporation process as a new cell labeling technique for SPIO nanoparticles.

Keywords: superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO), stem cells, sonoporation, MRI

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Kateřiny Polákové, PhD., a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu použitých zdrojů.

V Olomouci dne

Podpis

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Kateřině Polákové, Ph.D. za ochotu, odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky pro zpracování této práce. Děkuji Ing. Kateřině Tománkové Ph.D. za pomoc při realizaci výzkumu a Mgr. Markétě Havrdové za rady zvláště při zpracování dat. Poděkování patří také Mgr. Zdence Markové za poskytnutí SPIO nanočástic, díky nimž mohly experimenty proběhnout a díky patří také celému pracovnímu kolektivu v centru RCPTM a na Lékařské fakultě UP v Olomouci za příjemné pracovní podmínky.

Obsah

ÚVOD	8
TEORETICKÉ POZNATKY	10
1 Kmenové buňky	10
1.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSCs)	11
1.2 Tvar buněk	12
1.3 Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk	12
1.4 Terapeutické využití kmenových buněk	13
2 Biomedicínská nanotechnologie	16
2.1 Superparamagnetické nanočástice	17
2.1.1 Maghemit (γ -Fe ₂ O ₃)	18
2.1.2 Magnetit (Fe ₃ O ₄)	18
2.2 Kontrastní látky	19
2.3 Experimentální metody měření fyzikálně-chemických vlastností nanočástic.	20
2.3.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)	20
2.3.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)	21
2.3.3 Mössbauerova spektroskopie (MS)	22
2.3.4 Supravodivý kvantový interferenční magnetometr (SQUID)	24
2.3.5 Zeta potenciál (ζ)	24
2.4 Značení buněk SPIO nanočásticemi	24
2.5 Mechanismus inkorporace nanočástic do buněk	25
2.6 Aglomerace	26
2.7 Urychlení značení kmenových buněk SPIO nanočásticemi	26
2.7.1 Chemické postupy	27
2.7.2 Fyzikální metody	28
2.7.2.1 Ultrazvuk	28
2.7.3 Metody stanovení počtu buněk	42
2.7.4 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)	44
2.8 Testy cytotoxicity	45
2.8.1 Trypanová modř	45
2.8.2 MTT test	46

CÍLE PRÁCE	47
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
3 Materiály a metody výzkumu	48
3.1 Buněčné kultury	48
3.1.1 Kultivace mezenchymálních kmenových buněk (MSCs)	48
3.1.2 Pasážování MSCs	49
3.2 Stanovení koncentrace buněk	51
3.2.1 Bürkerova komůrka	51
3.2.2 Bio-rad TC10™	53
3.3 Zjištění viability buněk	55
3.3.1 Trypanová modř	55
3.3.2 MTT test	57
3.4 Vlastnosti superparamagnetických nanočástic smAM	58
3.5 Metody značení buněk SPIO nanočásticemi	59
3.5.1 Inkubace	60
3.5.2 Sonoporace	60
3.5.3 Značení ultrazvukem	64
3.6 Stanovení množství Fe na buňku	66
3.6.1 Kvantitativní stanovení - AAS	66
3.6.2 Kvalitativní stanovení - pruská modř	66
3.7 Výsledky	67
3.7.1 Interakce smAM nanočástic s buňkami během značení pasivní inkubací... ..	67
3.7.2 Viabilita buněk po sonoporaci	69
3.7.3 Značení metodou sonoporace	71
3.7.4 Efektivita značení buněk	72
3.7.5 MRI měření negativního kontrastu nanočástic smAM po sonoporaci	75
ZÁVĚR	77
Seznam použitých zkratk	79
Literatura	81

ÚVOD

Pojem kmenová buňka se objevuje již v 19. století, kdy bylo Virchowem a Schwannem popsáno, že tkáně savců obsahují „vůdčí“ buňky, jež se uplatňují při vzniku jiných buněk [1]. Problematika kmenových buněk zaznamenala velký rozvoj. Kmenové buňky představují jedinečnou populaci buněk, jejímž úkolem je vytvoření základů jednotlivých tkání a orgánů [2]. Jsou nediferencovanými elementy, tzn. bez specializace, které mají schopnost sebeobnovy [3] [4]. Jejich vysoký proliferační potenciál a schopnost diferenciaci do různých buněčných typů (kostí, tuku a chrupavek) z nich dělají velmi atraktivní nástroj pro regenerativní medicínu [5], kde zlepšují léčbu mnoha chorob díky náhradě poškozených tkání [2] [6].

Nanotechnologie je důležitou součástí četných biomedicínských aplikací od manipulace jednotlivých buněk až po jejich monitorování zobrazovací metodou MRI [7]. Toto sledování zjišťuje správnost doručení buněk do tkání a nabízí náhled do místa transplantace. Správné dávkování a načasování aplikací konkrétně kmenových buněk pak může vést k optimalizaci buněčné terapie [8]. S ohledem na obrovský potenciál nanočástic v medicíně se věří, že nanomedicína bude mít velký vliv na lidský život a bude platit věta, že „malé věci dávají velký smysl“ [9].

Cílem této práce je přiblížit čtenáři problematiku kmenových buněk ve spojení s nanotechnologickými postupy, které by v budoucnu mohly přispět ke klinické aplikaci v diagnostice molekulárního zobrazování, transportu léčiv a cílené terapie. Protože kmenové buňky patří mezi tzv. nefagocytující buňky, buněčný uptake nanočástic probíhá velmi pomalu. Tématem předložené diplomové práce je využití nové efektivní metody značení tzv. sonoporace. Cílem práce bylo najít optimální parametry ultrazvuku pro dosažení vysoké efektivity značení buněk in vitro magnetickými nanočásticemi a zároveň minimálně ovlivnit životní funkce těchto buněk.

Teoretická část práce se zabývá důležitostmi kmenových buněk, jejich funkcí a propojení s oblastí nanotechnologie. Popisuje superparamagnetické nanočástice a měřicí techniky pro jejich charakterizaci. Velká část je také věnovaná ultrazvuku, jeho fyzikálním vlastnostem a využitím v medicíně. Právě sonoporace se jeví jako výhodná neinvazivní metoda pro efektivní značení kmenových buněk SPIO nanočásticemi.

Praktická část práce se věnuje experimentům značení buněk, sledováním morfologických a proliferačních změn buněk v interakci s nanočásticemi nejprve během standardní inkubace. Dále je práce zaměřena na urychlení značícího procesu sonoporací za použití terapeutického ultrazvuku (BTL 4000, USA). Na buněčnou suspenzi umístěnou v testovacích zkumavkách se aplikovaly ultrazvukové vlny o různých intenzitách. Sledováním viability a proliferace buněk po ozvučení se stanovily optimální hodnoty ultrazvuku pro pozdější aplikaci během značícího procesu. Ultrazvuk má schopnost dočasně zvýšit propustnost buněčné membrány a tím zvýšit účinnosti inkorporace nanočástic do buněk. V další části se pojednává o způsobech stanovení koncentrace buněk. Pracovalo se jak s Bürkerovou komůrkou, tak s přístrojem Bio-rad TC10TM, díky němuž došlo ke značnému urychlení stanovení koncentrace buněk a jejich viability. K tomu, aby se získala informace o koncentraci železa na buňku je potřeba odseparovat buňky již naznačené. Musela se proto vždy provádět centrifugace za nízkých teplot. Důležitou charakterizací po každém značení bylo jednak kvantitativní stanovení množství železa připadající na jednu buňku pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS) a také kvalitativní ověření výskytu nanočástic uvnitř těla buněk pomocí optické mikroskopie. Na závěr se ověřil kontrastní účinek magneticky označených buněk na klinickém přístroji magnetické rezonance (MRI).

TEORETICKÉ POZNATKY

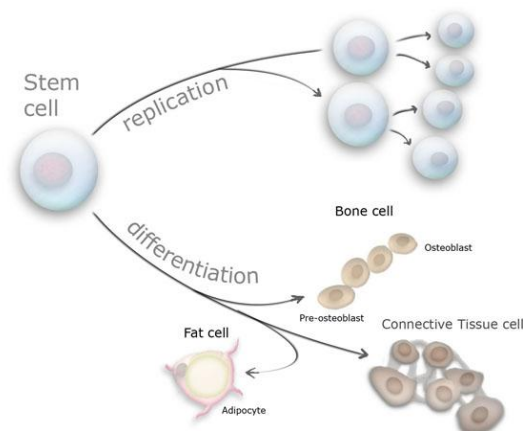
1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky se schopností vysoké proliferace, neomezené sebeobnovy a produkce dalších specializovaných buněk [10].

Mikroprostředí, ve kterém se kmenové buňky vyskytují, se označuje jako „niché“, které slouží jako rezervoáry kmenových buněk. Nacházejí se v kostní dřeni, kde podporují přežití a růst kmenových buněk tím, že poskytují vhodné prostředí pro udržení životaschopnosti buněk a současně zajišťují životaschopnost buněk a jejich dělení po celou dobu života organismu [11].

Po mitotickém dělení jedna dceřiná buňka opouští prostředí niché a diferencuje se. Druhá kmenová buňka zůstává uvnitř, kde má zajištěnou možnost vlastní sebeobnovy (Obr. 1). Jestliže opustí prostředí niché, pak uvolněné niché může přijmout jiné exogenní kmenové buňky. Počet niché ve tkáních lze měnit, indukovat, mohou také zanikat [2].

Hlavní úlohou kmenových buněk je udržet konstantní počet diferencovaných buněk v dané tkáni, tedy zajistit tkáňovou homeostázu náhradou buněk odumřelých nebo ztracených při poranění [12]. Buňky zůstávají převážně v klidové fázi. Svou schopnost sebeobnovy uplatňují až po poranění, při chorobách nebo při procesech stárnutí [13].



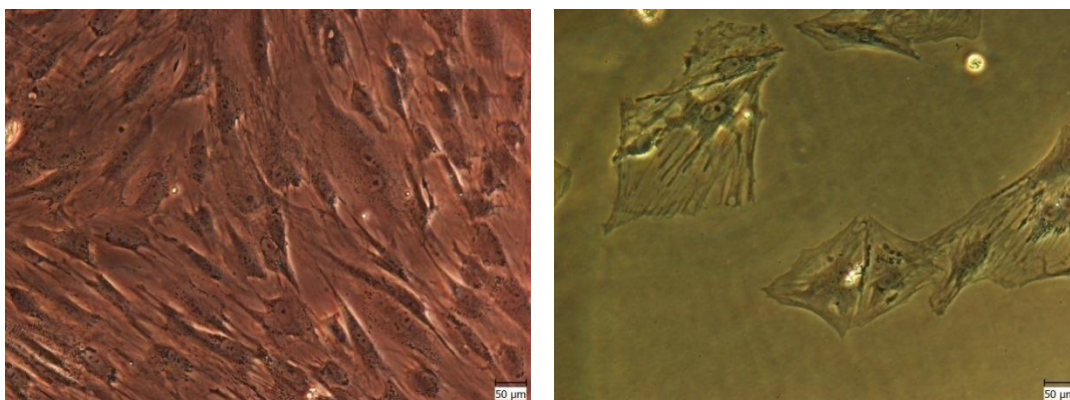
Obrázek 1: Kmenová buňka se rozdělí na dvě dceřiné – jedna diferencuje na jiný buněčný typ (např. na osteoblast) a druhá zůstane nezměněná (připravená pro další dělení) [14]

1.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSCs)

Mezenchymální kmenové buňky jsou multipotentní buňky nacházející se v kostní dřeni, tukové tkáni, pupečnickové krvi a v různých zárodečných tkáních [15]. V klinických studiích se MSCs izolují převážně z kostní dřene spolu s dalšími typy buněk a jejich separace se provádí podle exprese specifických molekul (markerů) na jejich povrchu [16]. Pro mezenchymální kmenové buňky jsou charakteristické tyto kombinace povrchových znaků (markerů): CD105, CD73 (SH3/4), CD44, CD90, CD71, Stro-1, CD106, CD166, CD29, CD54, podle kterých se specificky (imunologicky) odlišují od ostatních buněk [10].

1.2 Tvar buněk

MSCs izolované z kostní dřeně tvoří dva typy buněk: malé vřetenovité buňky (Obr. 2a) a velké krychlové nebo ploché buňky (Obr. 2b) [17] [18]. Malé buňky (vřetenovité) proliferují rychleji a mají vyšší potenciál k diferenciaci, než buňky, které se dělí pomaleji [19].

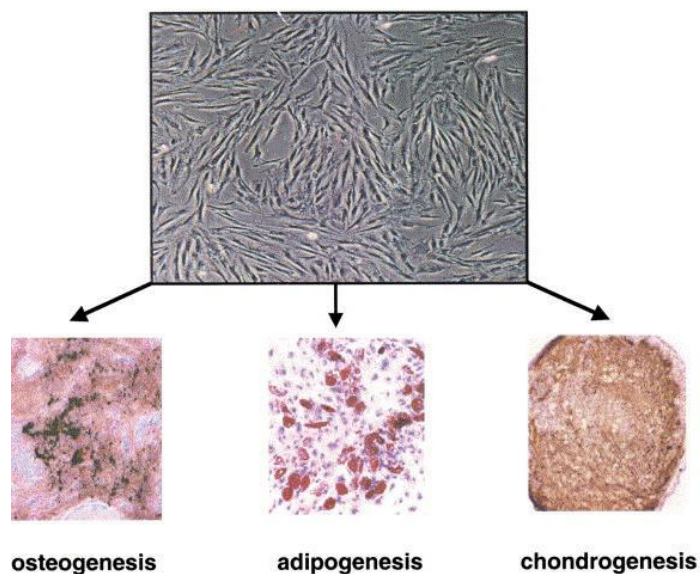


Obrázek 2: a) hMSCs – vřetenovité buňky; b) rMSCs - ploché buňky

1.3 Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk

MSCs jsou schopné se diferencovat na osteocyty, adipocyty, chondrocyty (Obr. 3) neurony a kosterní svalové buňky, ale i na cévní endoteliální buňky a myocyty. Těchto vlastností se využívá v buněčné terapii, pomocí níž se cíleně regeneruje poškozená tkáň [20].

Významnou roli v procesu diferenciaci hraje přítomnost živin, prostorová organizace, mechanické vlivy, růstové faktory a cytokiny [21].

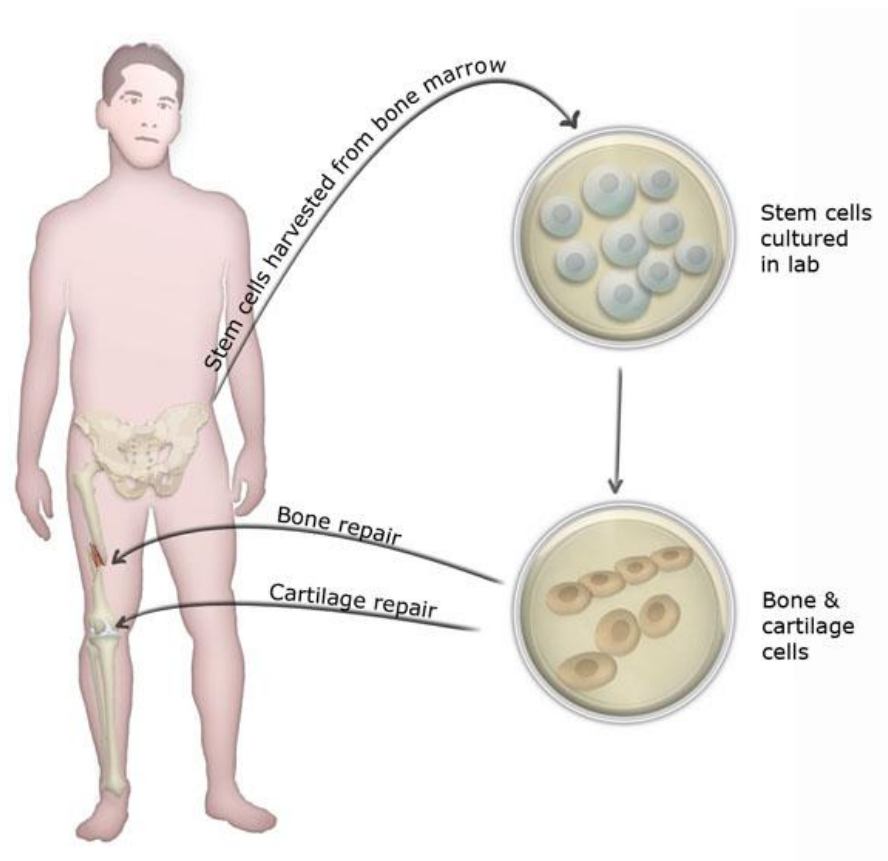


Obrázek 3: Mezenchymální kmenové buňky a jejich *in vitro* diferenciace: osteogeneze (tvorba kostní tkáně), adipogeneze (tvorba tukové tkáně), chondrogenese (tvorba chrupavek) [22]

1.4 Terapeutické využití kmenových buněk

Terapie s využitím kmenových buněk nabízí velký příslib léčby mnoha nemocí, zejména těch, které dosud nemají efektivní léčbu [23]. Díky unikátní vlastnosti diferenciace na různé typy tkání, jsou kmenové buňky ideálním zdrojem při regeneraci tkání v klinické aplikaci. Proto je těmto buňkám věnována značná pozornost v oblasti tkáňového inženýrství a buněčné terapie [24].

Slibný terapeutický účinek MSCs se opírá o jejich schopnost vstoupit se a dlouhodobě přežít v odlišné cílové tkáni [25].



Obrázek 4: Princip buněčné terapie [14]

Během klinických studií na zvířatech bylo dokázáno, že MSCs se mohou diferencovat na buňky zbytkové tkáně, obnovit poškozenou tkáň způsobenou úrazem nebo nemocí a navíc částečně obnovit normální funkci této poškozené tkáně. Neregenerují pouze mezenchymální tkáň jako je intervertebrální disk chrupavky, kosti, kardiomyocyty a kloubní chrupavky (Obr. 4), ale také se diferencují do epiteliálních buněk pokožky, plicní tkáně, jater, střev, ledvin a sleziny. Tyto univerzální schopnosti poukazují na široké využití kmenových buněk v oblasti buněčné terapie [11].

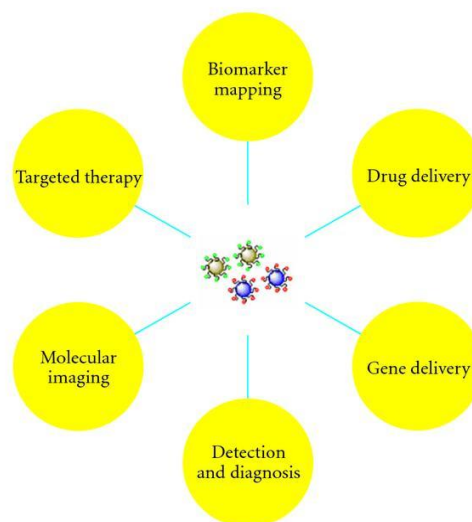
Studie kmenových buněk také otvírá možnosti léčby nervového systému, kdy se transplantovaná kmenová buňka diferencuje na nervovou buňku nebo produkuje cytokininy a růstové faktory, které vedou k zachování nervových buněk a zlepšení regenerace [8].

Několik klinických studií podpořilo názor, že buněčná terapie může být použita i pro srdeční regeneraci. Experimentální studie provedené na zvířatech ukázaly, že srdeční transplantace buněk je proveditelná a přispívá ke zlepšení kontraktilního výkonu myokardu po infarktu [25]. Tyto studie dávají vznik dalším možnostem v buněčné aplikaci při použití kmenových buněk v oblasti transplantace.

2 Biomedicínská nanotechnologie

Nanomateriály a nanotechnologie jsou již v současné době široce používány v biomedicíně, zejména v oblasti diagnostiky, doručování léků, tvorbě implantátů a protéz (Obr. 5). Biomedicínské aplikace využívající nanotechnologie či nanomateriály se dělí do dvou kategorií – aplikace in vitro a in vivo. Pro aplikaci in vitro byly k analýze krve a dalších biologických vzorků využity biosenzory či biočipy obsahující nanomateriály. Při aplikaci in vivo se hledají vhodné metody pro cílené dodání léčiv, zkoumají se možnosti a přínos genové terapie. Zavádí se moderní efektivní metody magnetické bioseparace na základě využití magnetických nanočástic. Nejčastější využití nanočástic v medicíně je však stále v diagnostické metodě magnetické rezonance (MRI), kde se používají nanočástice jako kontrastní látky nebo při terapii metodou hypertermie [26].

Jednu významnou skupinu nanomateriálů představují tedy magnetické nanočástice, u kterých se využívá jejich unikátních magnetických vlastností a to díky rozměru, který je pod 100 nm [26].



Obrázek 5: Schéma využití nanotechnologie v medicíně [9]

2.1 Superparamagnetické nanočástice

S klesajícím rozměrem magnetických nanočástic ubývá počet magnetických domén, kterými jsou tvořeny, až nastane limitní stav, kde je částice tvořena pouze jednou doménou. Magnetické momenty jsou uspořádány v rámci celé částice (domény) a kooperují spolu. Již takové jednodoménové částice vykazují navenek obrovský magnetický moment (tzv. superspin), jehož velikost se pohybuje v řádu tisíců až deseti tisíců Bohrových magnetonů ($\mu_B = 9,27 \cdot 10^{-24} \text{ J/T}$) [27].

Jedinečným se však magnetický materiál stává především, pokud kromě jednodoménovosti vykazuje také superparamagnetické chování. Superparamagnetismus je jev spojený s konečným rozměrem částic a lze ho jednoduše vyjádřit jako jev, při kterém je magnetický moment (spin) schopen změnit svůj směr během času pozorování. Typickou veličinou vyjadřující superparamagnetismus je tzv. relaxační doba τ , která je závislá na objemu (velikosti) částice a teplotě. Čím je objem částice menší, je teplotní energie částice dostatečná k tomu, aby došlo k překlopení magnetického momentu přes magnetickou anizotropní bariéru. Superparamagnetické částice tedy vykazují velmi rychlou odezvu na vnější magnetické pole [27]. Pouze takové superparamagnetické nanočástice lze uplatnit v metodě MRI jako kontrastní látky, tedy látky, které urychlují relaxační dobu a zvyšují kontrast dané tkáně, do které jsou vpraveny.

Superparamagnetické nanočástice se v medicíně nejčastěji vyskytují ve formě oxidů železa (Fe_3O_4 zvaný magnetit nebo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ zvaný maghemit [26]). Dále se dělí podle velikosti na VSPIO (Very Small Superparamagnetic Iron Oxide nanoparticle) s velikostí $< 10 \text{ nm}$, USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide nanoparticles) $\sim 20 \text{ nm}$ a SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide nanoparticles) $> 30 \text{ nm}$ [9]. SPIO nanočástice jsou obvykle stabilizované polymerní vrstvou dextransu, karboxydextransu, škrobu, albuminu, silikonu nebo polyethylenglykolu, aby nedocházelo k jejich agregaci (shlukování) [28].

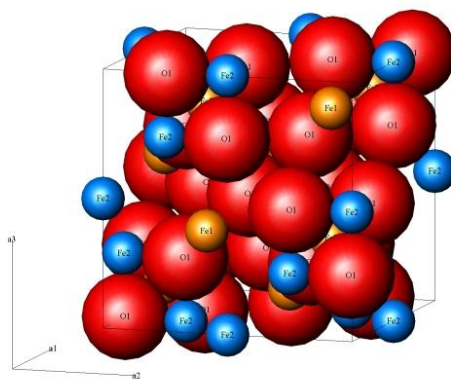
Polymerní vrstva nanočástic zajišťuje jejich biokompatibilitu, chrání jádro před biologickým rozpadem vlivem štěpných reakcí okolního prostředí a je možné ji chemicky modifikovat [9].

2.1.1 Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Maghemit je magnetický materiál s inverzní kubickou strukturou, která obsahuje vakance a kationty železa umístěné v tetraedrických a oktaedrických pozicích. Spinelová struktura se dvěma podmřížkami je příčinou ferrimagnetických vlastností látek. Díky velké saturační magnetizaci je maghemit z magnetického hlediska kolineárním feromagnetickým materiálem s nevykompenzovaným antiparalelním uspořádáním magnetických momentů v oktaedrických a tetraedrických pozicích. Navíc pod kritickým rozměrem 166 nm vykazuje jednodoménoost, pod 20 nm také superparamagnetismus. Při vyšších teplotách se maghemit transformuje na hematit [29].

2.1.2 Magnetit (Fe_3O_4)

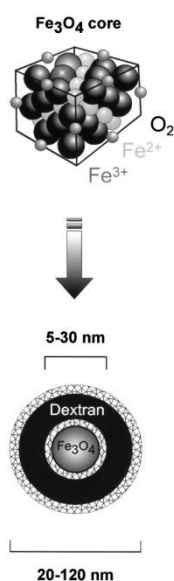
Magnetit, zvaný také magnetovec, je nejznámější strukturální formou oxidu železa (Obr. 6). Běžně se vyskytuje v přírodě ve formě minerálů obsahujících dvojmocné i trojmocné ionty železa. Magnetit vykazuje inverzní spinelovou strukturu [30]. Při pokojové teplotě se jedná o silně ferimagnetický materiál [29]. Superparamagnetický jev nastane u nanočástic s rozměry okolo 10 až 30 nm. Zajímavým způsobem získávání magnetitu a to ve formě tzv. magnetosomů je biomineralizace, kde jsou částičky magnetitu tvořeny uvnitř magnetotaktických bakterií. [30]



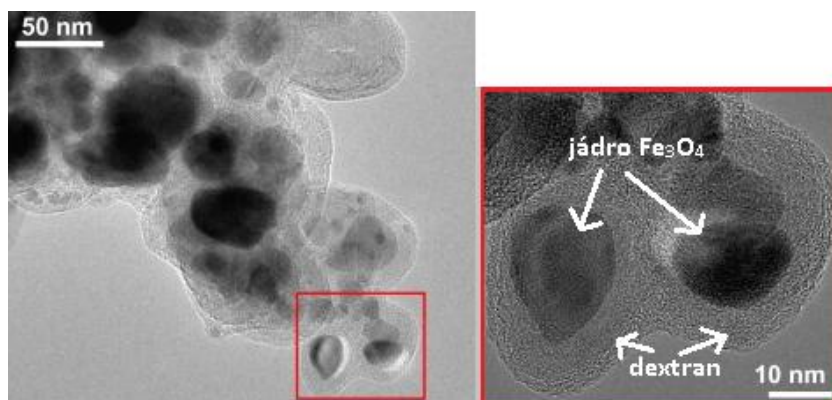
Obrázek 6: Schéma krystalové struktury magnetitu. Oktaedrické pozice Fe (modře), tetraedrické pozice (žlutě) a molekuly kyslíku (červeně) [31]

2.2 Kontrastní látky

Superparamagnetické kontrastní látky (SPIO) jsou tvořeny superparamagnetickým jádrem, které je tvořeno krystalickým oxidem železa, obecným vzorcem popsáno $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot M^{2+} \cdot \text{O}$, kde M je dvojmocný kovový iont ($M = \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$). Existují různé fyzikálně-chemické metody přípravy SPIO nanočástic. Nejčastěji se však využívá koprecipitace solí železa či termální dekompozice železo-obsahujících prekurzorů v mokré fázi. Následně jsou částice obaleny makromolekulární vrstvou, která je bývá tvořena dextrans, škrobem či dalšími polymery, které mohou být chemicky nebo biochemicky modifikovány (Obr. 7, Obr. 8) [8].



Obrázek 7: Schéma přípravy nanočástic oxidu železa obalených dextrans [8]



Obrázek 8: TEM snímek nanočástic obalených dextrans; poznámka: vpravo zvětšený výřez, kde šipky znázorňují krystaly magnetitu a amorfni vrstvu polymeru dextransu [32]

Superparamagnetické chování nanočástic zajišťuje vysoký hypointenzivní kontrast zobrazované tkáně metodou MRI. Existuje několik desítek komerčních kontrastních látek na bázi SPIO nanočástic lišících se velikostí (20 až 300 nm) v závislosti na cílové aplikaci (intravenózní či per-orální podání) [8]. Konečná podoba kontrastní látky může tvořit magnetické dendrimery, liposomy či micely obklopující magnetické jádro [9]. Různé úpravy povrchu nanočástic, např. konjugací určitých protilátek, umožňují kontrastním látkám specificky se vázat na danou tkáň [8]. Nejčastěji používaným obalem nanočástic je polysacharid dextran [26].

Využití kontrastních látek při neinvazivním zobrazení MRI přináší výhody jako je vysoká rozlišovací schopnost (20-100 μm) a vysoký kontrast měkkých tkání [9]. Při MRI zobrazování dané tkáně označené SPIO kontrastní látkou dojde ke zkrácení T1 a T2 relaxačních časů, přibližně o jeden nebo dva řády na rozdíl od standardní paramagnetické kontrastní látky. Proto jsme schopni pozorovat kontrastní změny i na buněčné úrovni [8].

2.3 Experimentální metody měření fyzikálně-chemických vlastností nanočástic

Pro aplikaci v mnoha vědních oblastech je nezbytné pochopit vlastnosti nanomateriálů [33]. K tomu se využívá široká škála měřicích technik jako je transmisní elektronová mikroskopie (TEM), dynamický rozptyl světla (DLS), Mössbauerova spektroskopie (MS), supravodivý kvantový interferenční magnetometr (SQUID) a stanovení zeta-potenciálu.

2.3.1 Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronový mikroskop slouží k získání informací o tvaru a velikosti studovaných materiálů [34]. Umožňuje zobrazit nanočástice s viditelným rozlišením až na úroveň jednotlivých krystalových rovin. K zobrazení využívá elektronový svazek emitovaný z wolframové katody. Svazek je urychlován vysokým napětím a fokusován magnetickými čočkami na vzorek [35]. Zatímco u SEM elektronový svazek na vzorek

dopadá, v případě TEM svazek vzorkem prochází. Dochází k pružnému a nepružnému rozptylu svazku elektronů. Po průchodu elektronového svazku vzorkem je obraz pozorován na stínítku pokryté luminoforem, které emituje světlo různých intenzit podle množství dopadajících elektronů a velikosti energii. Vzniká obraz, který je možné pozorovat okem. Krátká vlnová délka elektronového svazku snižuje rozlišovací mez a tak umožňuje zobrazení jednotlivých atomů [36].

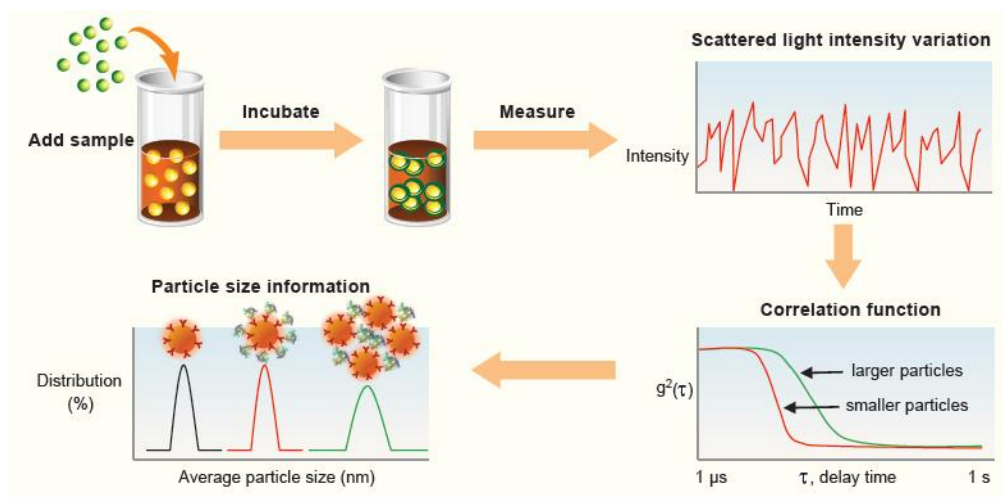
Příprava vzorku se liší v závislosti na daném materiálu. Práškové vzorky jsou naneseny na uhlíkovou podložku, složitější a časově náročnější je příprava biologických vzorků. Je nutné, aby preparáty byly dostatečně tenké (10 - 200nm), byly zbaveny veškeré vody a případně pokoveny [35] [36].

2.3.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Metoda dynamického rozptylu světla, nazývaná rovněž jako foton korelační spektroskopie (PCS) se používá pro stanovení distribuce velikosti částic [37].

Princip je založen na interakci koherentního záření s částicemi, při které dochází k interferenci. Ta je závislá na vzdálenosti mezi částicí a detektorem. Částice, pohybující se díky Brownově pohybu, mění vzdálenost, kterou musí rozptýlené světlo k detektoru urazit (Obr. 9). Výsledkem je fluktuace intenzity, ze které se získá korelační funkce. Tato funkce představuje vztah mezi průměrem intenzity v čase $(t + \tau)$ a v čase t [37].

Výsledky dynamického rozptylu světla bývají ve shodě s výsledky elektronového mikroskopu, pokud se pozorují jednotlivé oddělené částice. Pokud částice tvoří shluk (agregát), detekuje metoda DLS velikost tohoto shluku a ne velikost jednotlivých částic tvořících daný shluk [37].

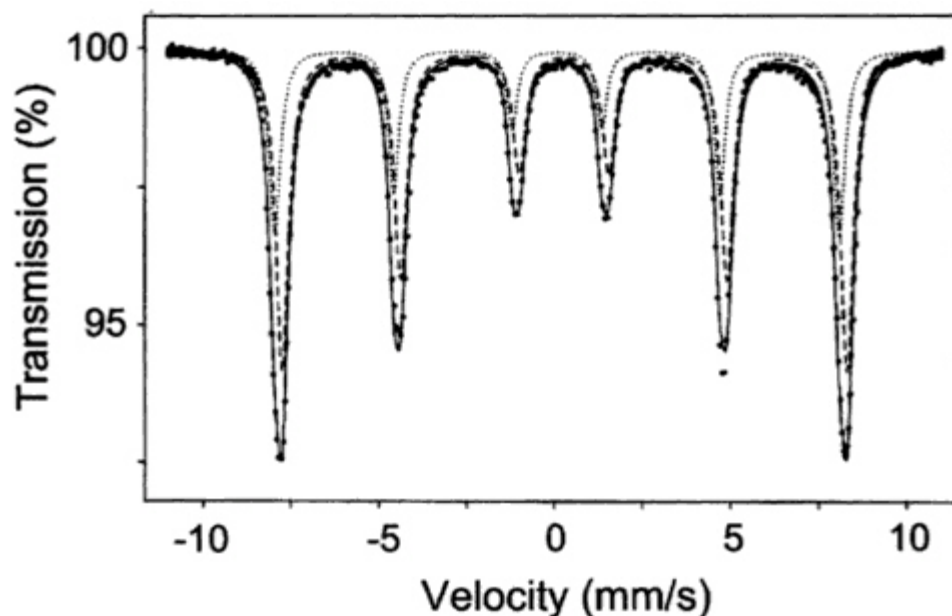


Obrázek 9: Schéma procesu stanovení distribuce velikosti částic [38]

2.3.3 Mössbauerova spektroskopie (MS)

Mössbauerova spektroskopie využívá efektu bezdrazové rezonanční emise a absorpce γ - záření specifickými jádry atomů v pevných látkách [39]. Energie jádra emitující γ - kvantum se rozdělí mezi emitované kvantum a jádro. Jádro odnáší energii, která je rovná energii zpětného nárazu. Protože má záření méně energie než je potřebné k přeskoku, nemůže být jádrem zpětně absorbováno. Řešením je připevnit jádro do krystalové mřížky, kdy je energie zpětného rázu velmi malá. To vede k bezdrazové emisi γ - kvant. Tento úkaz je podstatou Mössbauerova jevu [40].

Zdrojem γ -záření je radioaktivní zářič, který emituje kvanta záření. Během emise kvant se zářičem pohybuje tak, aby mohlo dojít k absorpci energie emitovaného kvanta stejnými atomy v absorbátoru. V důsledku Dopplerova jevu při tomto pohybu dochází ke změně energie γ -fotonů na energii vhodnou k rezonanci. Výsledkem je mössbauerovské spektrum, které udává závislost intenzity prošlého γ -záření na relativní rychlosti pohybu zářiče. Z výsledných Mössbauerových spekter získáme informace týkající se kinetiky a mechanismů fázových či magnetických přechodů látek, charakteru vazeb, struktury látek a valenci, (Obr. 10) [39] [41].



Obrázek 10: Mössbauerovské spektrum syntetického maghemitu při pokojové teplotě se sextety pozice A (tečkovaná) a pozice B (čárkovaná) [42]

Interakce jádra měřeného vzorku s okolním elektromagnetickým polem se nazývají hyperjemné interakce. K hyperjemným interakcím patří izomerní posun udávající polohu středu mössbauerovského spektra a kvadrupólové štěpení ϵ_Q u jader, která nemají sférický tvar náboje jádra. Tento nesférický tvar náboje se ve spektru projevuje přítomností dubletu. Kvadrupólové štěpení může také poskytnout informaci o elektronové populaci jednotlivých elektronových orbitalů, oxidačním a spinovém stavu, struktuře ligandů a reakčních meziproductech s krátkými časy života, polovodičových vlastnostech a o defektech ve struktuře pevné látky. Mezi hyperjemné parametry se dále řadí magnetické dipólové štěpení, které je založeno na tzv. Zeemanově jevu. Tento jev, způsoben interakcí magnetického momentu jádra s vnějším magnetickým polem, vyvolá štěpení spektra na sextet. Podává informaci o velikosti a směru magnetického pole v okolí jádra [41].

Hlavní výhodou Mössbauerovy spektroskopie je její nedestruktivnost, 100% selektivita pro daný prvek a možnost studovat amorfní i krystalické materiály. Doba měření zkoumaného vzorku může probíhat několik hodin, až dní [39].

2.3.4 Supravodivý kvantový interferenční magnetometr (SQUID)

Měření částic SQUID technikou slouží k měření magnetického toku Φ . Podává nám informace o typu látky, chování vzorku v magnetickém poli a o teplotě přechodu do uspořádaného stavu. SQUID je založený na supravodivém kvantovém interferenčním jevu [43] [44]. Jeho podstatou je supravodivý prsteneček využívající dva kvantové jevy, tj. Josephsonův jev a kvantování magnetického toku [45]. Prstencem prochází tunelovací proud ve formě Cooperových elektronů. Vlivem vnějšího magnetického pole získají supraproudy různé fáze a výstupní proud bude závislý na velikosti magnetického toku procházejícího skrz supravodivý prsteneček. Mezi dvěma supraproudy procházejícími polovinami supravodivého prstence dochází k interferenci [44]. Na základě měření hysterezní smyčky (závislost intenzity magnetického pole H a indukce B) lze charakterizovat globální magnetické vlastnosti zkoumaného materiálu (feri-, fero-, antifero či superparamagnetismus). Pokud budeme vystavovat vzorek měření v poli a bez pole za různých teplot (tzv. FC a ZFC křivka) zjistíme i blokovací teplotu či zda dochází v daném materiálu k mezičásticovým interakcím.

2.3.5 Zeta potenciál (ζ)

Zeta potenciál je metoda stanovující velikost náboje na povrchu částic, tedy zda jsou částice kladně či záporně nabitě. Díky existenci tzv. elektrokinetických jevů (kinetických dějů způsobených vlivem elektrického pole na koloidní soustavu) se Zeta potenciál označuje také jako elektrokinetický potenciál [37].

Koloidní nabitá částice se obaluje ionty opačného znaménka. Tím dojde na povrchu částice ke vzniku dvou nabitých vrstev, tzv. elektrická dvojvrstva [37]. *“Elektrický náboj dvojvrstvy charakterizuje a zároveň ovlivňuje stabilitu koloidních vzorků.”* (Kvítek, 2006)

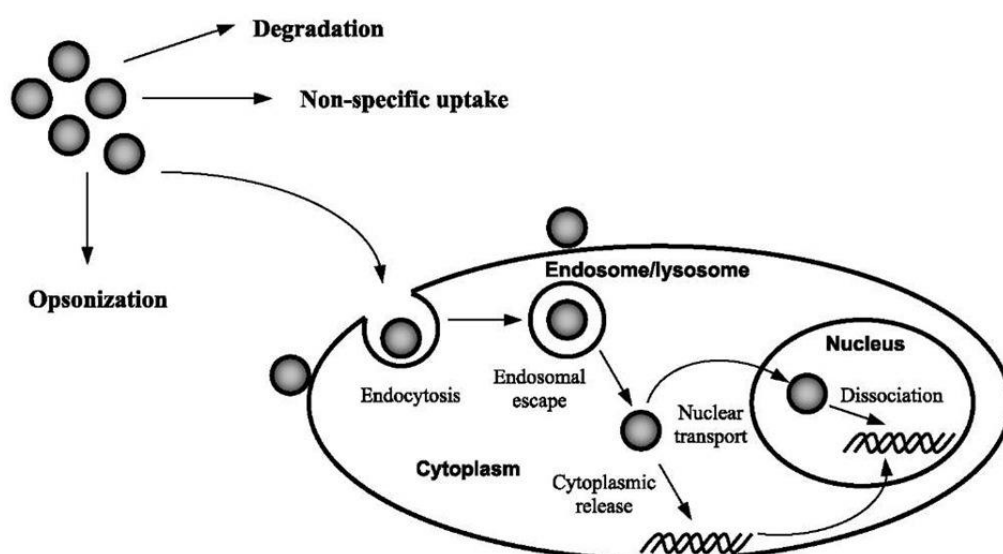
2.4 Značení buněk SPIO nanočásticemi

Superparamagnetické nanočástice oxidů železa jsou preferovaným materiálem v bioaplikacích, protože jsou biokompatibilní, netoxické a mají unikátní magnetické vlastnosti. Nejčastější in vivo aplikací SPIO částic je jejich využití jako kontrastních

látek v metodě MRI, protože poskytují, jak již bylo řečeno výše, vysoký kontrast v T2 a T2* vážených kontrastech. Lze je použít jako samotné kontrastní látky nebo jako magnetické značky pro buňky. V současnosti se cílená buněčná terapie, například transplantace kmenových buněk do těla pacienta, stává moderní léčebnou metodou. Právě diagnostika neboli sledování buněčné terapie je součástí kvalitní léčby. Zde se ukázalo, že SPIO částice hrají zásadní roli. Díky internalizaci SPIO částic do kmenových buněk se transplantované buňky stávají samy kontrastními na rozdíl od nativních buněk v těle. Studium mechanismu interakce nanočástic s buňkami je předmětem studia řady laboratoří a vědeckých týmů.

2.5 Mechanismus inkorporace nanočástic do buněk

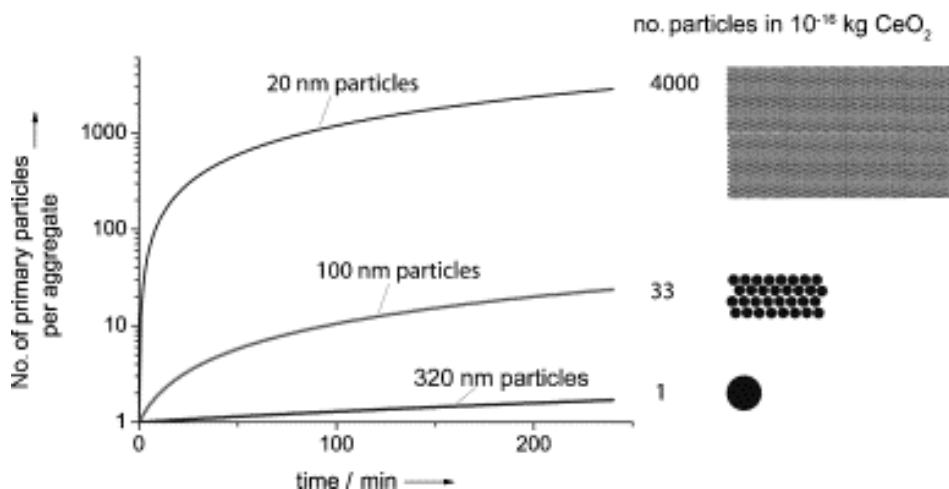
Mechanismus vychytávání nanočástic buňkami není zatím plně znám. Studie uvádějí údaje o aktivním či pasivním transportu zprostředkovaném přes buněčnou membránu. Průnik nanočástic přímo do cytosolu vyžaduje specifické vlastnosti povrchu [46]. V závislosti na povrchu nanočástic, zda je hydrofobní nebo hydrofilní, na náboji a na adsorpci proteinů (tzv. opsonizaci), vstupují nanočástice do buňky buď endocytózou (prostřednictvím membránových váčků) nebo do cytosolu pronikají difúzně (Obr. 11) [46].



Obrázek 11: Inkorporace nanočástic do intracelulárního prostoru buňky [47]

2.6 Aglomerace

Částice jsou schopny vytvářet shluky, tzv. aglomeráty. Dochází ke změně velikosti klastrů částic, která ovlivňuje jejich průnik do buňky. U nanočástic bez povrchové úpravy o koncentraci 1 μg částic na mililitr vznikají při aglomeraci z malých vysoce pohyblivých částic velké prakticky nepohyblivé agregáty. [46].



Obrázek 12: Závislost počtu nanočástic tvořící výsledný shluk (aglomerát) na čase potřebném pro membránový transport dovnitř buňky; v grafu jsou znázorněny odlišné průběhy kinetiky buněčného uptake pro různě velké počáteční nanočástice [46]

Průnik částic do buněk silně závisí na průměrné velikosti částic. Větší částice, např. 320 nm, jsou poměrně těžké, pronikají přes membránu pomalu (Obr. 12) a nevytvářejí značné shluky. Naopak nanočástice s průměrem 20 nebo 100 nm mají vyšší difúzní koeficient a prochází buněčnou membránou rychleji. Malé nanočástice se ale také rychleji shlukují a uvnitř buněk může docházet k jejich sedimentaci [46].

2.7 Urychlení značení kmenových buněk SPIO nanočásticemi

Běžnou metodou internalizace nanočástic do buněčného cytosolu je prostá inkubace částic v přítomnosti buněk. Standardní doba inkubace bývá 24 nebo 48 hodin. V závislosti na velikosti a povrchových vlastnostech nanočástic (náboj, hydrofilicita, funkční skupiny aj.) a typu buněčné linie (adherentní, neadherentní, fagocytující,

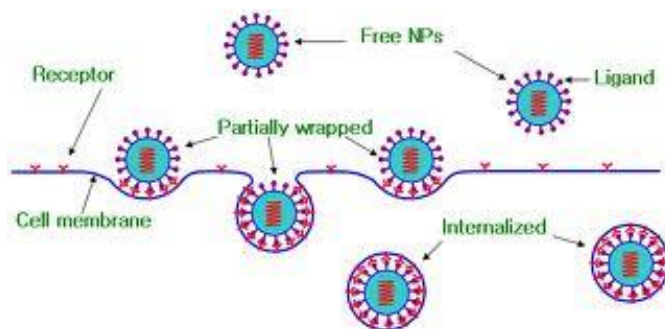
nefagocytující) je proces buněčného uptaku více či méně efektivní. Proto se zavádějí pomocné postupy, které mají membránový transport urychlit a zkvalitnit. Lze je rozdělit na metody chemické a fyzikální.

2.7.1 Chemické postupy

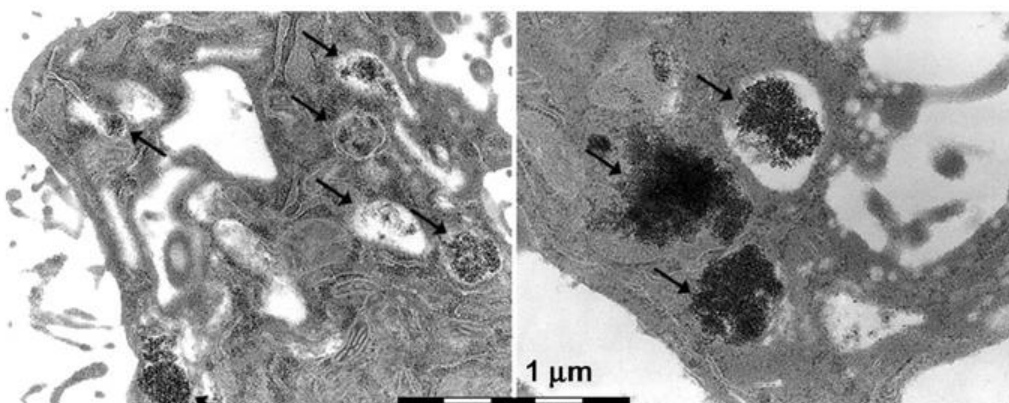
Transfekční činidla

Kmenové a progenitorové buňky nefagocytují, a proto nanočástice pohlcují méně, než buňky fagocytující. Pro zvýšení efektivity značení se používají transfekční činidla, jako jsou polykationty dendrimery a činidla lipidového základu (např. poly-L-lysin, poly-N,N-dimethylakrylamid). Tyto velké, silně nabitě molekuly vytvoří s nanočásticemi komplex a absorbují se na buněčnou membránu pomocí elektrostatické interakce, což vede k endocytóze [48]. Pomocí transfekčních činidel je značení buněk nanočásticemi efektivní [49]. Vysoká koncentrace transfekčního činidla však může způsobit toxicitu a buňky poškodit [50]. Proto je třeba pečlivě stanovit poměr transfekčního činidla a nanočástic k získání stabilního netoxického celku [51].

Nanočástice s polymerním obalem se do buněk dostávají především pinocytózou nebo případně difúzí. Značení probíhá za standardních podmínek, tzv. **inkubace**. Nanočástice se na buňku nejdříve adherují a po určitém čase je buňka pohltní (Obr. 13) [23] [52]. Účinnost pohlcení nanočástic buňkou je limitována počtem membránových receptorů buňky. Nevýhodou této metody je toxický charakter transfekčního činidla a dlouhý inkubační čas v porovnání s fyzikálními metodami. Je nutné, aby buňky setrvaly s nanočásticemi v živném médiu několik hodin až dnů, během čehož může dojít ke změnám vlastností buněk (Obr. 14) [53].



Obrázek 13: Pinocytóza nanočástic buňkou [52]



Obrázek 14: Buňky značené nanočásticemi v den značení (vlevo) a po 7 dnech (vpravo) [7]

2.7.2 Fyzikální metody

Elektroporace, magnetoelektroporace a ultrazvuk mění permeabilitu membrány a umožní tak nanočásticím prostoupit do cytosolu. Jsou to metody, při kterých se nemusí nanočástice s buňkami dlouho inkubovat. Dojde při nich k výraznému urychlení buněčného uptake [23].

Sonoporace

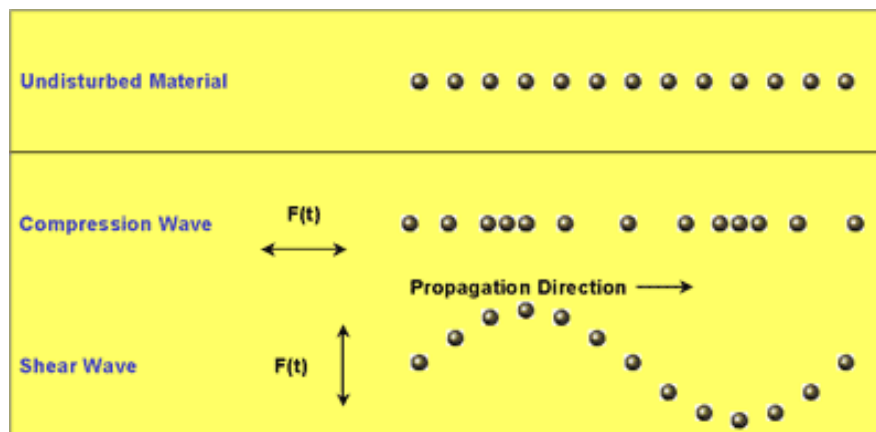
Značení buněk nanočásticemi při sonoporaci se realizuje pomocí ultrazvukového zařízení.

2.7.2.1 *Ultrazvuk*

Ultrazvuk, známý také pod pojmem sonografie, je široce používán v klinické praxi jako diagnostický, chirurgický a terapeutický nástroj [54]. Princip ultrazvuku je založen na odrazech mechanického vlnění od pozorovaného objektu s různou akustickou impedancí. Zdrojem ultrazvukových vln je tzv. piezoelektrický krystal, který působením střídavého elektrického proudu deformuje svůj tvar. Krystal je uložen v sondě, která může být různě tvarovatelná. Nejvíce využívané jsou sondy sektorové, lineární a konvexní. Kromě tvaru se sondy liší také vysílanou frekvencí, která se

pohybuje v rozsahu 2-5 MHz pro zobrazení hlubších struktur v diagnostice a mezi 5 – 15 MHz pro sledování povrchových struktur mající menší dosah, ale lepší rozlišovací schopnost [55].

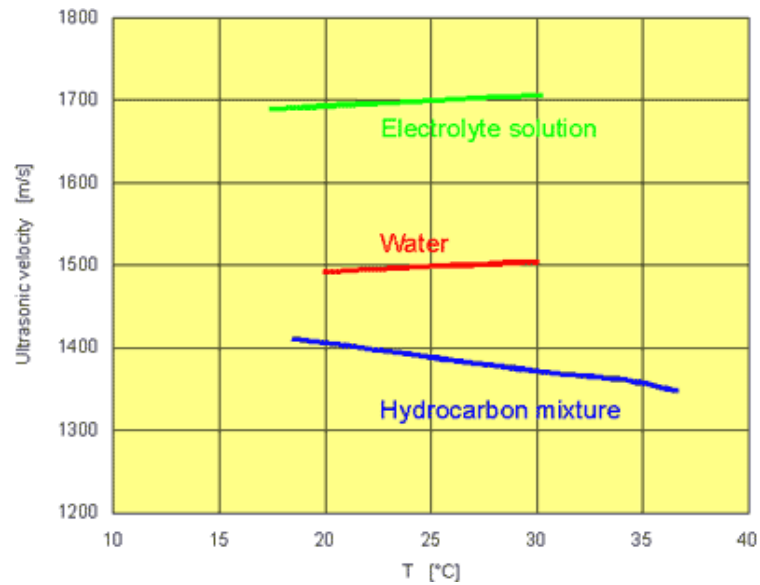
Ultrazvuk se šíří prostředím kmitavým pohybem. Částice kmitá ve směru šíření vlny (longituální vlnění) anebo ve směru kolmém na směr šíření vlny (transversální vlnění) (Obr. 15). Příčné vlnění na rozdíl od podélného se může šířit pouze v pevných látkách [56].



Obrázek 15: Schematické znázornění šíření ultrazvukové vlny materiálem. $F(t)$ je vysokofrekvenční sinusoidální síla, která působí rovnoběžně nebo kolmo k povrchu vzorku (spíš ve směru šíření vlny)[57]

Při průchodu prostředím dochází k útlumu ultrazvukového vlnění. Na tom se podílí absorpce, při které se mechanická energie mění na tepelnou, dále odraz, lom a rozptyl [58]. Rychlost šíření ultrazvukového vlnění je závislá na teplotě prostředí (Obr. 16).

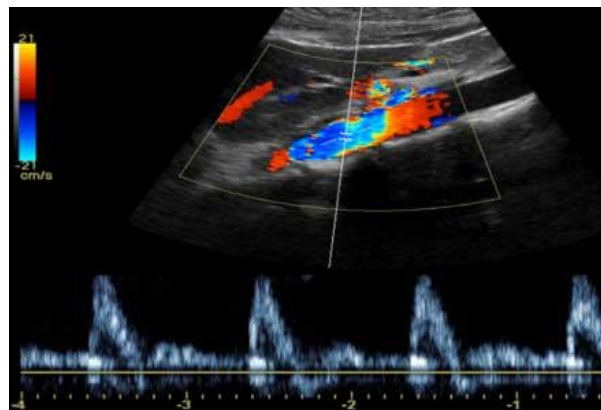
Ultrazvuková vlna je charakterizována amplitudou, frekvencí, vlnovou délkou a koeficientem útlumu [56].



Obrázek 16: Rychlost šíření ultrazvuku v různých materiálech v závislosti na teplotě [57]

Dopplerův jev

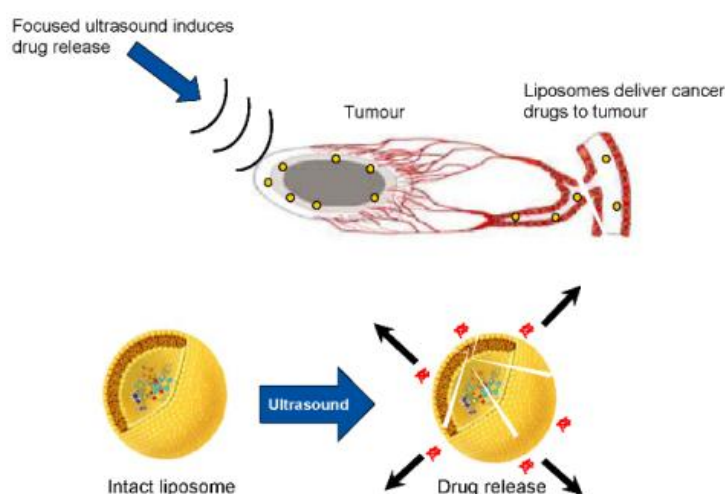
Při ultrasonografických vyšetřeních se využívá Dopplerova jevu, tzn. změny frekvence mechanického vlnění při odrazu od pohybujícího se objektu. Výsledkem je buď křivka nebo barevný záznam pohybujících se objektů v obraze B-modu (brightness mode) (Obr. 17) [55].



Obrázek 17: Duplexní záznam z ultrazvukového vyšetření. V horní části snímku je barevně mapovaný obraz B-modu. V dolní části je dopplerovská křivka [59]

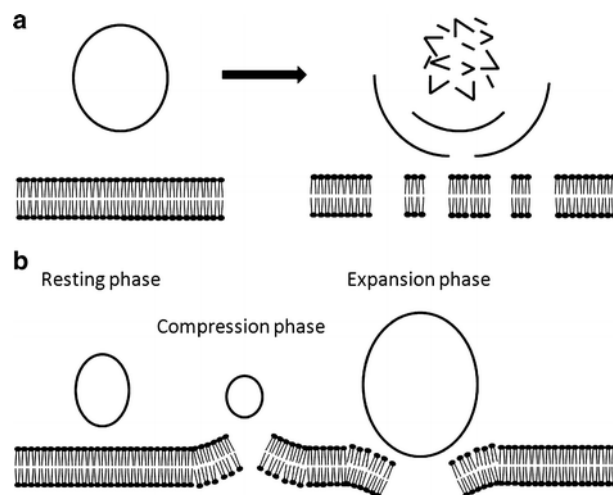
Terapeutický a diagnostický ultrazvuk

V praxi se využívá terapeutický a diagnostický ultrazvuk. Terapeutický ultrazvuk je efektivní zobrazovací metoda, která využívá ultrazvukové vlnění s nízkou frekvencí 0,8 – 3 MHz, což vede k dočasné perforaci buněčné membrány, k tzv. sonoporaci. Narušená buněčná membrána se stane dočasně propustnou a nanočástice jsou schopné projít do intracelulárního prostředí. Prokázalo se, že touto metodou dojde ke snazší propustnosti, neboli transfekci, velkých substrátů, jako jsou proteiny, DNA a léčiv do buněk a tkání (Obr. 18) [60]. Výhodou této metody je rychlost značení velkého počtu buněk najednou za krátkou dobu (řádově jednotky minut). Další výhodou je nízká cena a vysoká bezpečnost [9]. Pravděpodobnost rozšíření využití ultrazvuku na různé typy buněk a nanočástic je velká, protože se jedná o nechemickou, nevirovou a neinvazivní metodu, která v případě sonoporace umožňuje doručování léčiv [61].



Obrázek 18: Zvýšená propustnost léčiv do buňky je zajištěna ultrazvukovými vlnami, které vytvoří přechodné póry v plasmatické membráně [62]

Diagnostický ultrazvuk pracuje s vysokou frekvencí a buňky přitom neporuší. Princip je založen na činnosti mikrobublin, díky kterým se na buněčné membráně vytváří dočasné nescifické póry a to buď v důsledku „shear stress“ doprovázeným kolapsem mikrobublin a nebo díky přímé interakci mikrobublin s membránou (Obr. 19) [60]. Tyto póry umožňují jinak nepropustným extracelulárním látkám na krátký okamžik vstup do buňky [53].



Obrázek 19: Vznik pórů působením ultrazvuku (a) „shear stress“ na membránu v důsledku kolapsu mikrobubliny, (b) deformace membrány způsobené vibracemi bubliny [60]

Mikrobubliny přítomné v ultrazukovém poli reagují střídavě na kompresi a expanzi cyklů ultrazukových vln tím, že mění svůj průměr. To proto, že je v nich obsažen plyn, který je stlačitelnější než okolní tkáň. Tato metoda využívající ultrazuk a mikrobubliny pro přenos látek se označuje jako MBUS („microbubble ultrasound“) [60]. Podle Ferila (2009) by mikrobubliny mohly pomocí specifických ligandů zvýšit účinnost in vivo sonoporace.

Biofyzikální účinky ultrazvuku

Účinky ultrazukové expozice na biologické systémy jsou s ohledem na složitost a různorodost biologických objektů předmětem mnoha výzkumů [58]. Účinky ultrazvuku se liší dle typu tkáň [63]. Zásadní význam má frekvence, expoziční doba a intenzita ultrazvuku [56]. Vysoká intenzita vlnění může vést k poškození buněk a nevratným změnám [63]. Lze říci, že intenzity do $1,5 \text{ W.cm}^{-2}$ mají účinek spíše biopozitivní, dochází k urychlení fyzikálně – chemických reakcí. Intenzita vyšší než 3 W.cm^{-2} způsobuje ireverzibilní morfologické změny jako je rozbití buněčného jádra, koagulaci bílkovin apod. [64].

Podle výsledku interakce vlnění s buňkou lze biologické účinky dělit na stimulační, charakteristické zrychlením životních pochodů, a inhibiční, charakteristické zpomalením či zástavou životních pochodů [56].

Základními projevy ultrazvuku v kapalných prostředích jsou tepelné a netepelné účinky [65]. Tyto dva efekty jsou neoddělitelné, v každém okamžiku interakce ultrazvuku s tkání jsou přítomny oba jevy. Výjimkou je lipotrypsy, která způsobuje výhradně mechanický efekt [66].

Tepelné účinky ultrazvuku

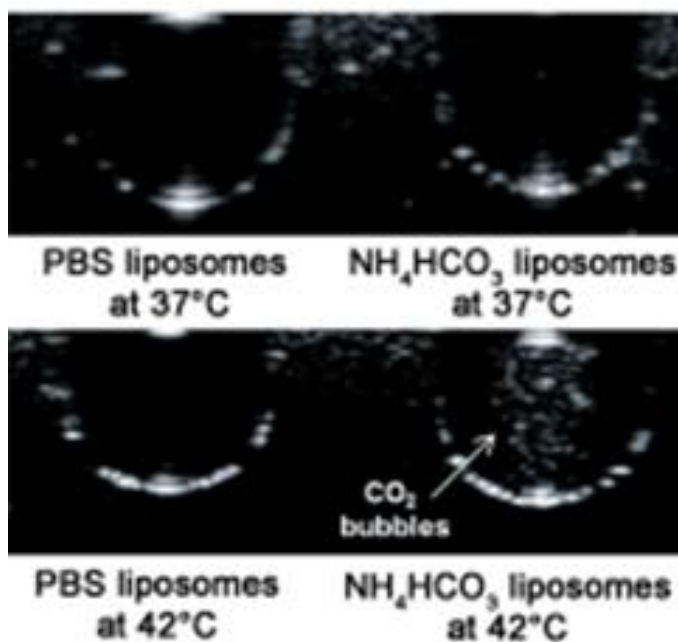
Tepelné účinky ultrazvuku jsou způsobené vysokou intenzitou terapeutického ultrazvuku, kdy dochází k přeměně akustické energie na teplo. Ultrazvuková vlna ztrácí asi 30% své energie [64]. Nejvyšší ohřev vzniká na rozhraních dvou akustických prostředí s vysokým rozdílem akustické impedance [56].

Průchodem ultrazvukové vlny přes tkáň je ultrazvuková energie absorbována rychlostí, která je úměrná hustotě tkáně. Tato absorpce ultrazvukového signálu vyvolá zvýšení teploty tkáně. Dojde tak k rozkmitání atomů, molekul, částic i celých buněk a nastává tzv. mikromasáž [64]. Každá změna teplot vyvolá automatickou reakci ve snaze obnovit normální teplotu. K vyrovnání teplot ve tkáních slouží homeostatické mechanismy. Z výsledků experimentálních prací týmu Draper a spol. (1993) vyplývá, že homeostáza není schopná zcela zabránit rychlému nárůstu teploty ve tkáni a velikost ohřevu je tak primárně závislá na krevním zásobení tkáně [66] [67].

Ve výsledku velikost tepelného účinku závisí na množství absorbované energie, měrné tepelné kapacitě prostředí, velikosti prostředí a na dynamické rovnováze mezi příivodem a odvodem tepla [58].

Pod vedením Min-Fan Chung (2012) byla vypracována výzkumná práce popisující vliv teplot na vznik kavitačních bublin za přítomnosti hydrogen uhličitanu amonného (NH_4HCO_3), který se využívá v potravinářském průmyslu jako součást kypřicího prášku. NH_4HCO_3 se za zvýšené teploty rozložil na CO_2 bubliny. Tato sloučenina snadno pronikla do liposomů, které se internalizovali do buněk. U PBS liposomů nebyly bubliny zpozorovány ani při jedné z nastavených teplot. Tytéž výsledky byly u vzorku NH_4HCO_3 liposomů při teplotě 37°C . Avšak zvýšením teploty na 42°C se u vzorku NH_4HCO_3 liposomů objevily CO_2 bubliny. Po rychlém růstu těchto

bublin nastal kolaps. Došlo ke kavitaci, o které je známo, že může mít zásadní vliv při terapeutických aplikacích stejně jako použití ultrazvuku (Obr. 20) [68].



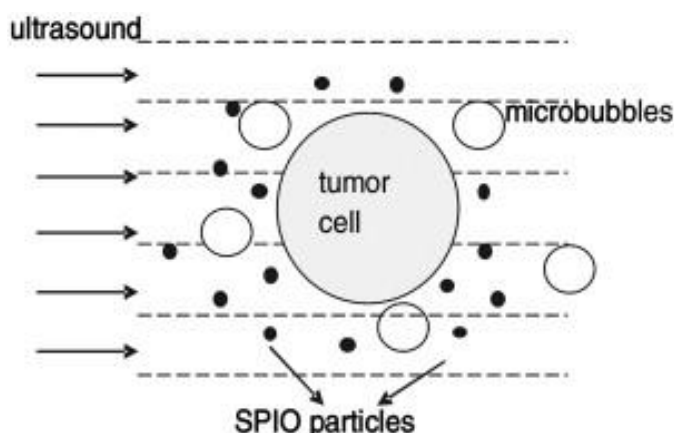
Obrázek 20: Ultrazvukové snímky liposomů čistě v PBS a liposomů obsahujících NH₄HCO₃ uložených ve vodném prostředí a zahřátých na 37° C a 42 ° C [68]

Důkazem, že ultrazvuk o nízkých intenzitách vykazuje schopnost in vivo zvýšit diferenciaci a proliferaci osteoblastů, zlepšuje místní prokrvení a angiogenezi, je pokus Zhi-min Ying (2012). Experiment byl proveden na zvířecích modelech, přičemž byl aplikován pulzní ultrazvuk Lipus a pozorovala se stimulace hojení šlachy kostí na buněčné a molekulární úrovni [69].

Při vystavení „stresovému teplu“ produkují savčí buňky tzv. proteiny tepelného šoku. Vědci se domnívají, že tyto proteiny pomáhají chránit buňky před tepelným poškozením. Ultrazvuk však ohřívá tkáň tak rychle, že buňky nemusí mít dostatek času na vytvoření si těchto ochranných proteinů. NCPRP (National Council on Radiation Protection and Measurements) upozorňuje proto na možná rizika používání ultrazvuku, zejména při expozici plodu [70]. K.G. Baker zmiňuje pozitivní tepelné účinky, které vedou ke zvýšení metabolické aktivity, průtoku krve a mají analgetický účinek na nervy [66].

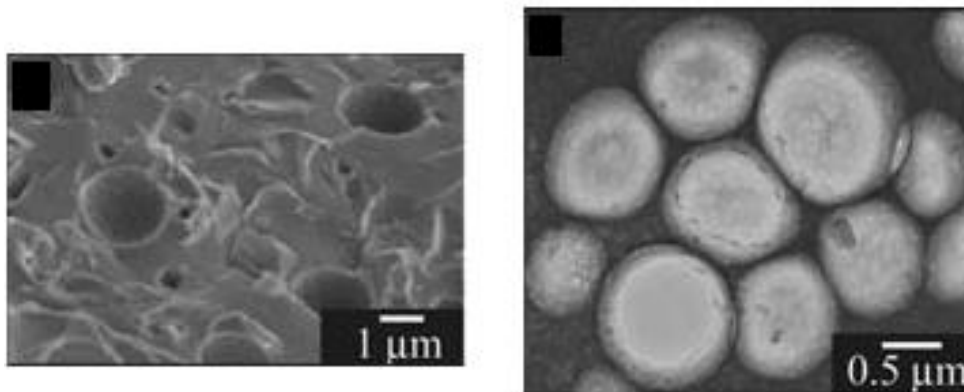
Mechanické účinky ultrazvuku

Neteplné účinky jsou obvykle spojeny s kavitací a jeho přidruženými efekty [66]. **Kavitace** byla na počátku 20. století definována sirem Johnem Thornycroftem jako „vznik a život bubliny v kapalině“. Jedná se o ultrazvukem buzené radiální kmity plynových mikrobublin, které jsou výsledkem ultrazvukových vibrací (Obr. 21) [66] [65]. Je jednou z hlavních mechanismů způsobující změny biologické tkáně jako například zvýšení propustnosti membrány [69].



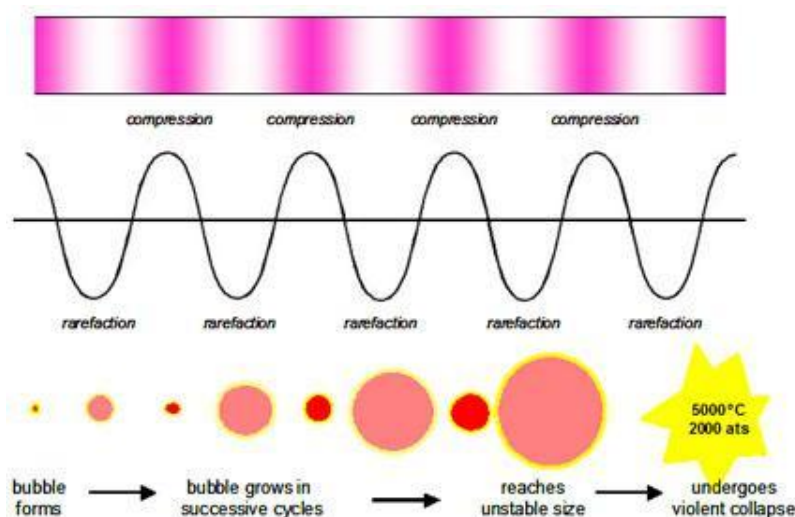
Obrázek 21: Schéma mechanismu účinku a interakce ultrazvuku, mikrobublin, magnetické nanočástice a buňky [53]

Podle typu vzniku i podle účinnosti se rozlišují dva typy kavitace - *stabilní a přechodná* [63]. Stabilní kavitace je v angličtině známá jako "noninertial cavitation". Každá vzniklá bublina působením ultrazvuku prochází velkým množstvím akustických cyklů [69]. V akustickém poli zároveň dochází k periodické změně tlaku, která vede k oscilaci velikosti bublin [65]. Přitom bubliny vysílají sekundární vlny do všech směrů a odrazem vln zpět do snímačů mohou například zlepšit ultrazvukové snímky při vyšetřeních. Proto se v praxi aplikují umělé bubliny do těla jako kontrastní látka (Obr. 22) [70].



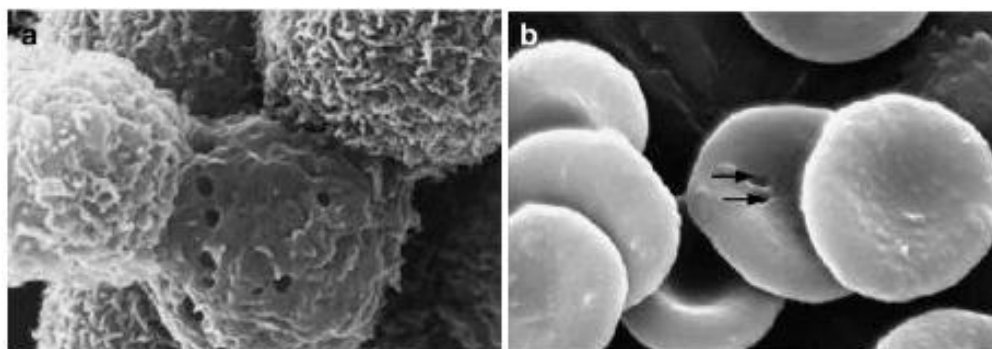
Obrázek 22: (A) Cryo-SEM snímek bublin. (B) Cryo-TEM obraz bublin [71]

U kavitace přechodné vzniká tzv. kolaps [65]. Periodickým zmenšováním či zvětšováním poloměru dojde k překonání hraničního objemu a přítomné molekuly se rozpadají za vzniku volných radikálů. Zároveň zhroucení původní bubliny dává vznik velkému množství mikrobublin, které se mohou stát novými kavitačními jádry [56]. Těsně před dosažením minimálního poloměru bubliny došlo ke vzniku rázové vlny, která konverguje směrem ke středu bubliny a vzniká sonoluminiscence trvající kratší dobu než padesát pikosekund. Tuto skutečnost ověřili svým experimentem Barber, Putterman a jejich spolupracovníci. Při rozpínavosti bubliny dochází k opačným procesům, viz obr. 23 [65]. Faktory ovlivňující vznik kavitace jsou přítomnost plynových bublin, jejich množství, velikost a umístění [70].



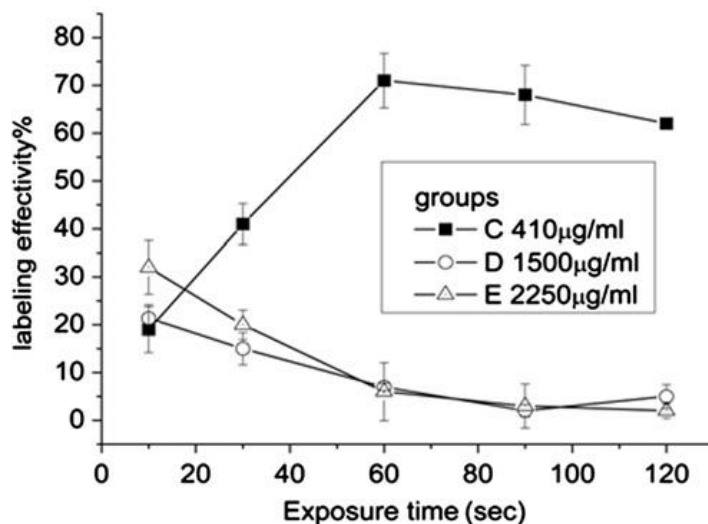
Obrázek 23: Proces akustické kavitace [72]

Jiné mechanické účinky ultrazvuku zahrnují změny v tlaku, v síle a v točivém momentu. Nevyžadují přítomnost bublin. Mohou způsobit slyšitelné zvuky a elektrické změny v buněčné membráně, které vedou ke vzniku pórů znázorněných na obr. 24 a tím se zvýší propustnost molekul a jejich pohyblivosti v kapalině [70]. Jev mikroproudění (microstreaming) naopak využívá přítomnosti bublin, které jsou urychlovány akustickým tlakem ultrazvukového pole. To vede ke změně propustnosti buněčné membrány, stimuluje buněčnou aktivitu anebo může způsobit poškození buněk [66].



Obrázek 24: Snímek ze SEM zachycuje (a) nádorové buňky (adenokarcinom) potkana (b) a červené krvinky po expozici ultrazvukem o intenzitě 2,25 MHz. Šipky ukazují na vzniklé póry v membráně [73]

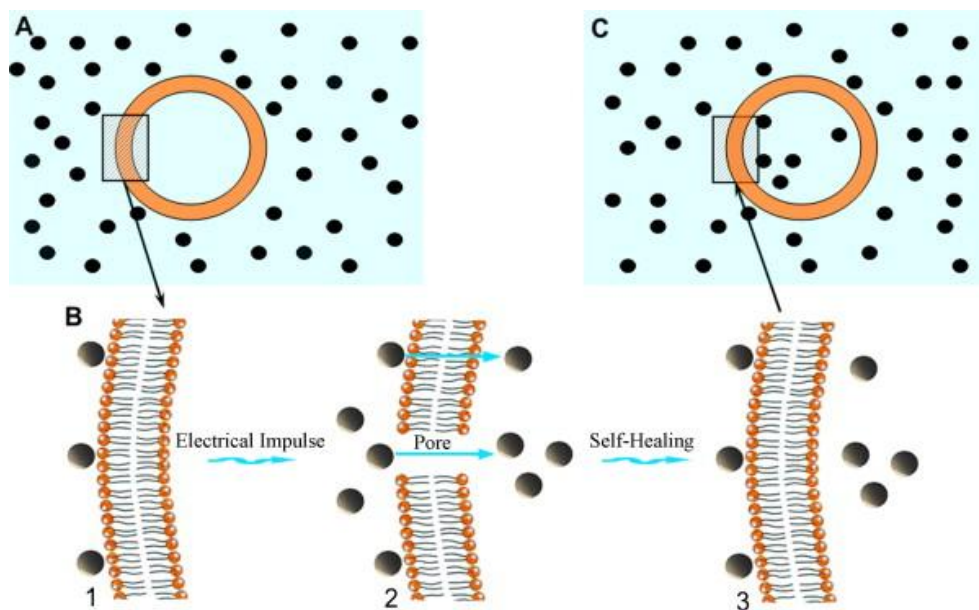
Efektivita uptake nanočástic pomocí ultrazvuku byla studována Runyang Mo a spol. (2010). Z obr. 25 vyčteme, že při nižší koncentraci SPIO nanočástic a působení ultrazvuku do 60 minut dosahuje efektivita značení $69,4 \pm 603\%$. Při vyšších koncentracích s expoziční dobou efektivita značení poklesla. Jako možnou příčinu uvádějí vznik ultrazvukové kavitace vedoucí k buněčné smrti a tak ke snížení celkového počtu buněk. Druhou příčinou může být aglomerace a následná sedimentace částic, které pak už s buňkami neinteragují [53].



Obrázek 25: Závislost efektivity značení buněk SPIO částicemi při různých koncentracích na čase [53]

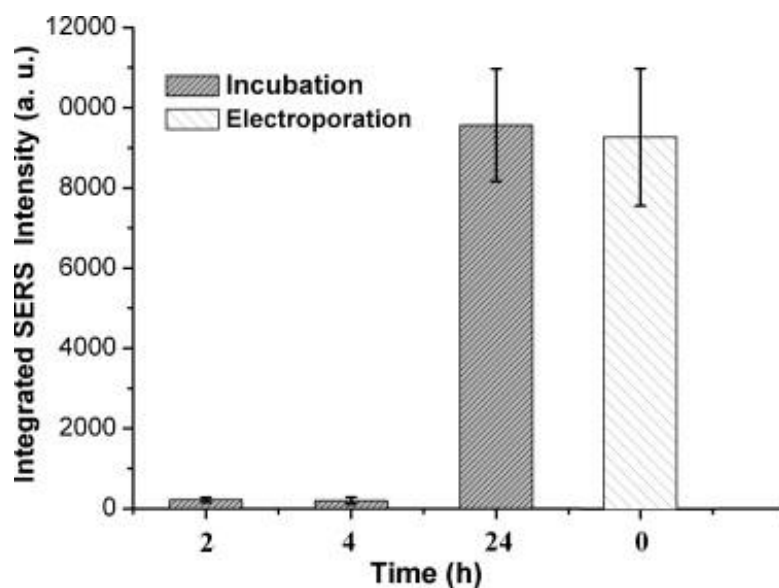
Elektroporace

Elektroporace, nazývaná také elektropermeabilizace, využívá vysokého elektrického napětí ke zvýšení propustnosti buněčné membrány nanočásticím. Elektrické impulzy dočasně poruší membránu a vytvoří na ní póry o průměru od 20 do 200 nm, které umožní inkorporaci nanočástic do buňky (Obr. 26). Tyto póry mohou být vratné či nevratné v závislosti na velikosti a délce elektrických impulzů a také v závislosti na vlastnostech buněk. Změnou délky impulzu se mění intenzita elektrického pole. Přestanou-li se elektrické impulzy vysílat, buněčná membrána se opět zacelí a plní dále funkci semipermeabilní bariéry [74]. Elektroporace se dělí do dvou skupin – na elektroporaci shluku buněk a na elektroporaci jednotlivých buněk. Výhodou této metody je její jednoduchost a snadná opakovatelnost [75].



Obrázek 26: Schéma procesu inkorporace nanočástic (černé tečky) do intracelulárního prostoru pomocí elektroporace. a) Inkubace buněk s nanočásticemi. b) Elektroporace buněčné membrány s následným uptakem nanočástic do cytotolu buňky. c) Obnovení buněčné membrány opět s funkcí bariéry [74]

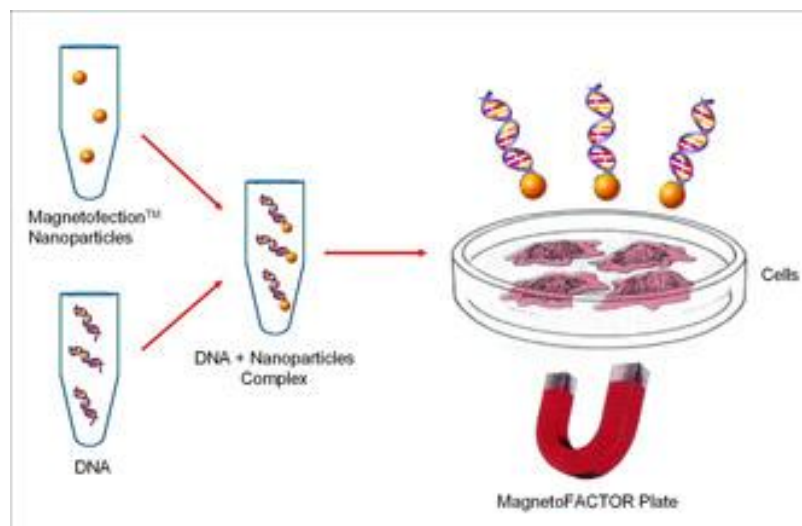
Velkým přínosem elektroporace a magnetoporace je jejich rychlost. Nevyžadují dlouhou inkubaci buněk a k označení velkého počtu buněk najednou je záležitostí několika málo minut (Obr. 27) [23] [52]. Všechny tyto metody vyžadují vysokou úroveň řízení bezpečnosti, aby viabilita buněk, jejich migrační schopnost a jiné vlastnosti zůstaly nezměněné [76].



Obrázek 27: Porovnání intenzity uptake nanočástic buňkami po 2h, 4h a 24h inkubaci s efektivitou elektroporace [74]

Magnetofekce

In vitro značení buněk nanočásticemi pomocí transfekčních činidel využívá metoda magnetofekce. SPIO nanočástice se záporným nábojem jsou spojeny poly-L-lysinem, který má kladný náboj a usnadňuje vazbu částic na záporně nabitou buněčnou membránu. Vznikem této vazby a vlivem vnějšího magnetického pole se zvýší během několika málo minut inkorporace nanočástic do buňky [23] [52]. Nanočástice s poly-L-lysinem jsou inkubovány s buňkami v kultivačním médiu po dobu 24 h [75]. Magnetofekcí získáme například transfekci nukleových kyselin, které jsou navázané na nanočástice a vnějším magnetickým polem vtaženy do buněk (Obr. 28) [77].



Obrázek 28: Transfekce DNA navázaných na nanočástice do buněk [77]

Přítomnost vnějšího magnetického pole se využívá při nádorové terapii k zacílení nádorů pomocí SPIO nanočástic. Výhodou je malý výskyt vedlejších účinků a nízká provozní cena [77].

Je zde několik typů běžně dostupných polymerem obalených nanočástic o velikosti 100 – 200 nm, které byly používány při in vitro i in vivo studiích pro magnetofekci. Také se sledovala cytotoxicita těchto nanočástic ve zdravých a nádorových buňkách [77].

Magnetoelktroporace (MEP)

Mnohem rychlejší metodou než magnetofekce je magnetoelktroporace. Je to šetrná metoda, která nevyžaduje přítomnost transfekčních činidel. Využívá nízké napětí, které indukuje buňky k endocytóze nanočástic. Jinak tomu bylo při elktroporaci působením vysokého napětí na buňku, které vedlo k vytvoření pórů sloužící nanočásticím jako otvor do intracelulárního prostoru. MEP metodou je možné značit velké množství buněk během několika minut, aniž by docházelo k inhibici nebo změně metabolismu buněk. Bylo dokázáno, že množství nanočástic internalizovaných v buňkách během MEP závisí na velikosti buněk. Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) mají například větší cytoplazmu, která je schopná naakumulovat vyšší počet nanočástic v porovnání s malými neuronovými kmenovými buňkami [75].

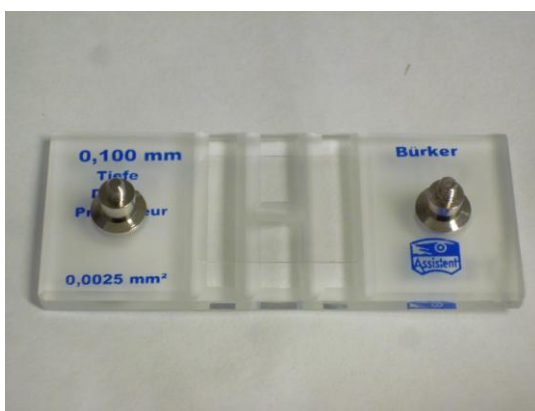
Na základě uskutečněných experimentů je značení buněk SPIO nanočásticemi bezpečné [52]. Účinnost magnetického značení buněk závisí na vlastnostech membrány a velikosti částic [23].

2.7.3 Metody stanovení počtu buněk

Bürkerova komůrka

Potřeba spočítat množství buněk nastává při standardních buněčných testech, jako je stanovení proliferace, či viability, ať už u označených nebo kontrolních buněk. Znat počet buněk ve vzorku je důležité také pro určení množství inkorporovaných nanočástic do buněk, tedy pro zjištění koncentrace železa na určitý počet buněk. Bürkerova komůrka (Obr. 29) slouží k určení koncentrace buněk na 1 mililitr.

Na jednom mikroskopickém sklíčku jsou vybroušena dvě pole s hloubkou 0,1 mm. Dno každého pole tvoří síťovitý obrazec, na kterém se buňky počítají. Jedná se o jednoduchou metodu, která je mnohdy považována i za nejpřesnější [78].



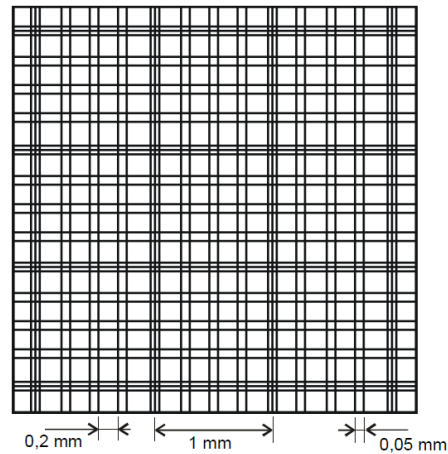
Obrázek 29: Bürkerova komůrka počítací [78]

Buňky se počítají systematicky ve vybraných čtvercích Bürkerovi komůrky po nanesení suspenze buněk s nanočásticemi. Dvě z používaných metod jsou popsány níže.

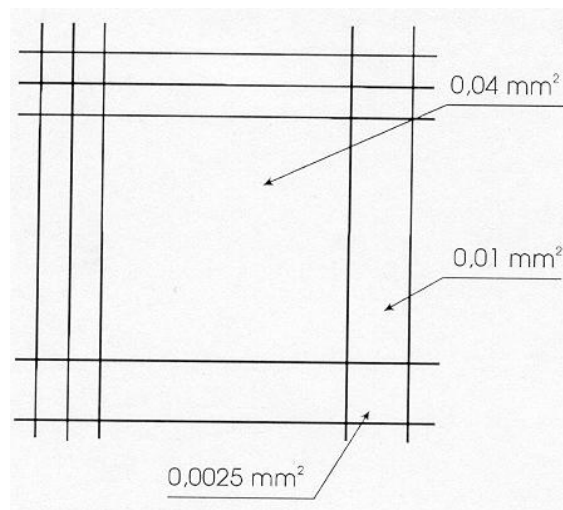
A. První metoda

Stanoví se 5 velkých čtverců na horním i dolním síťovitém obrazci (Obr. 30), ve kterých se buňky počítají. Tyto velké čtverce dále obsahují 16 malých čtverců (Obr. 31).

Do počtu se nezapočítávají ty buňky, které leží na pravé a dolní hraně malého čtverce ty, které leží v mezičtvercových prostorách a buňky ležící ve vnitřním prostoru čtverce z méně než 50% svého objemu [78].



Obrázek 30: Jeden ze síťovitých obrazců na počítačící komůrce [78]



Obrázek 31: Jeden z šestnácti malých čtverců, kde se počítají buňky náležící alespoň z 50% svého objemu vnitřnímu prostoru mřížky [78]

Pro výpočet množství buněk na 1 mm³ platí vztah:

$$P = \frac{\frac{N}{H}}{S} \quad [\text{buněk/ mm}^3]$$

N celkový počet buněk

Přepočet buněk na ml: 1 ml = 1000 mm³

H hloubka komůrky

(výsledek) * 1000 = [buněk/ml]

S plocha čtverců

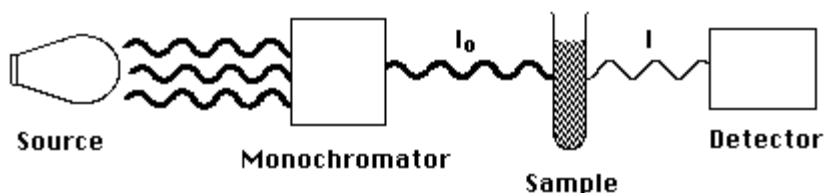
B. Druhá metoda

V tomto případě se používá stejná Bürkerova komůrka popsaná výše. Na síťovitém obrazci určí dva první nebo dva poslední řádky, kde se buňky počítají. Dva řádky po 12 čtverečcích plus jeden čtvereček z 3. řádků vytváří počítací plochu. Celkový počet buněk je dán celkem z 25 menších čtverečků. V tomto případě se započítávají i ty buňky, které leží na pravé a dolní hraně čtverce. Stejný princip počítání se zopakuje u druhého síťovitého obrazce Bürkerovy komůrky. Součet buněk z obou síťovitých obrazců se následně vynásobí 10 000. Výsledkem je hodnota, která udává počet buněk na 1 mililitr [78].

2.7.4 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie je analytická metoda kvantitativního stanovení prvků v roztoku. Princip je založen na měření absorpce monochromatického záření volnými atomy sledovaného vzorku. Prostředí, ve kterém dochází k absorpci, se nazývá atomizátor. Množství absorbovaného záření je úměrné množství volných atomů prvku ve vzorku. Zdrojem záření je výbojka s dutou katodou, která emituje čárové spektrum měřeného prvku. Intenzita výsledné spektrální čáry je zeslabena absorbcí, tj. mírou absorpce záření [79].

Přístroj je vybaven zdrojem záření dvojitým monochromátem a detektorem (Obr. 32) [79]. AAS Využívá plamenové atomové absorpční spektroskopie, která vyžaduje vzorek v tekuté formě. Výhodou analytické metody je jednoduchost přístroje [80].



Obrázek 32: Schéma absorpčního spektrometru [81]

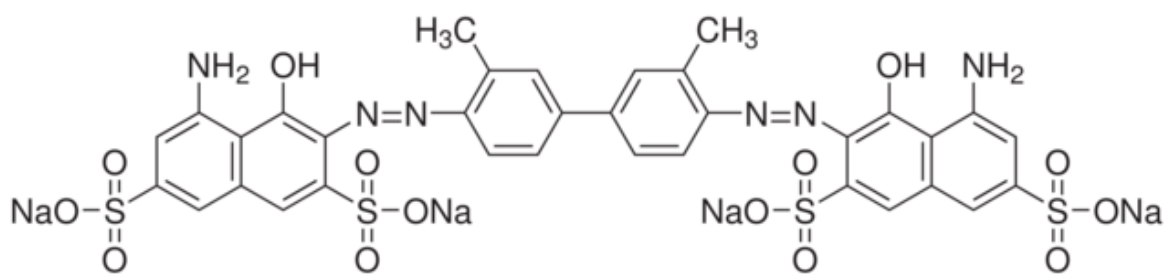
2.8 Testy cytotoxicity

Při práci s buněčnými liniemi a studium interakce nanočástic s buňkami je vždy doprovázen sledováním cytotoxicity. Zjišťuje se, zda mají nanočástice negativní vliv na viabilitu či proliferaci studovaných buněk. Mezi běžné metody studia cytotoxicity patří barvení Trypanovou modří a MTT test.

2.8.1 Trypanová modř

Jedná se o roztok 0,4% trypanové modře v 0,81% chloridu sodném a 0,6 % fosforečnanu draselném. Jeho součástí je negativně nabitý chromofor. Jeho strukturální vzorec je k vidění na obr. 33. Za normálních okolností nereaguje s vnitřním prostředím buňky. Trypanová modř prostupuje pouze přes narušenou plazmatickou membránu mrtvých buněk do intracelulárního prostoru. Podle zabarvení se stanovuje počet živých a mrtvých buněk v buněčné suspenzi [82].

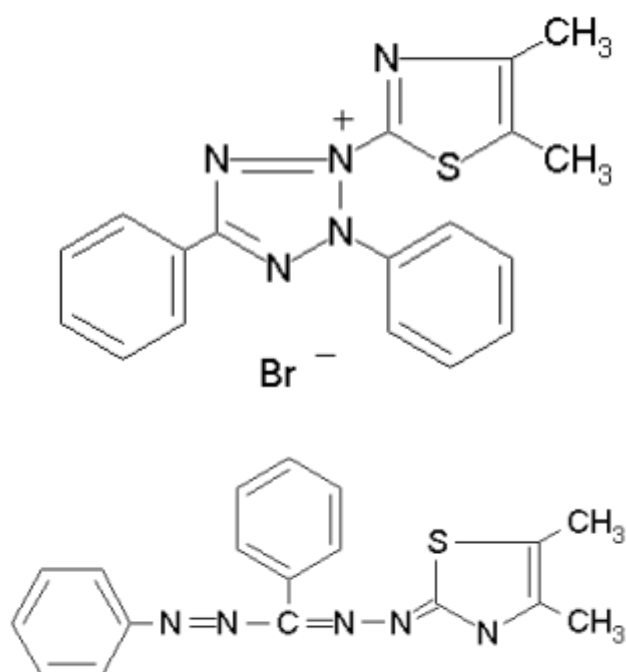
Živé buňky zůstanou bezbarvé, zatímco mrtvé buňky, u nichž je porušena integrita buněčné membrány a jejich transportních mechanismů, se rychle zbarví na modro. Buňky se počítají pomocí optického mikroskopu [82]



Obrázek 33: Strukturální vzorec Trypanu (karcinogen) [83]

2.8.2 MTT test

Podstatou testu je methyltetrazoliové soli (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), která se při reakci s mitochondriálními enzymy živých buněk redukuje na barevný, ve vodě nerozpustný formazan (Obr. 34). Měří se aktivita mitochondriálních dehydrogenáz, jež jsou aktivní u metabolicky aktivních buněk. Analýza probíhá spektroskopicky. Sleduje se změna zbarvení ze žluté na fialovou barvu. Ta označuje buňky živé. Výstupem je graf nelineární regrese, v němž IC[50] dává hodnotu, při které nastává buněčná smrt u 50% buněk [84].



Obrázek 34: Oxidovaná forma MTT a strukturální vzorec formazanu používaného při MTT testu [85]

CÍLE PRÁCE

- kultivace, pasážování a zjišťování viability a proliferace kmenových buněk, popř. fibroblastů metodou MTT a pomocí optického mikroskopu
- značení buněk magnetickými nanočásticemi pomocí ultrazvuku (sonoporace), stanovení viability a proliferace buněk po sonoporaci
- stanovení přítomnosti železa v buňkách – kvalitativní (použití pruské modři) a kvantitativní (metodou AAS)
- optimalizace metody sonoporace, nalezení ideálních parametrů intenzity, frekvence a doby sonoporace pro efektivní značení buněk SPIO nanočásticemi
- porovnání účinnosti značení buněk (rychlost, množství Fe na buňku, viabilita buněk) sonoporací s metodou pasivní inkubace
- ověření MRI kontrastu buněk označených sonoporací

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3 Materiály a metody výzkumu

V praktické části se pracovalo s kmenovými buňkami lidskými (hMSCs) a potkaními (rMSCs), které byly připraveny podle návodu Mgr. Josefa Skopalíka na Lékařské fakultě MU Brno, a fibroblasty získanými z Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Pozorovala se jejich proliferaci a po dosažení dostatečného množství buněk se provádělo pasážování (rozsazení do více kultivačních jamek). Dále následovalo počítání a stanovení viability pomocí trypanové modři. Na viabilní buňky o dosažené proliferaci (většinou 200 tisíc buněk na jamku) se aplikovaly SPIO nanočástice, vyrobené v RCPTM centru Mgr. Zdeňkou Markovou. Součástí práce bylo stanovení viability a koncentrace železa v buňkách, optimalizace metody sonoporace a porovnání s metodou pasivní inkubace nanočástic s buňkami.

3.1 Buněčné kultury

3.1.1 Kultivace mezenchymálních kmenových buněk (MSCs)

Kultivace kmenových buněk se provádí metodou *in-vitro*, kdy jsou buňky sledovány mimo živý organismus. K tomu je třeba přizpůsobit jim prostředí, ve kterém budou buňky viabilní (životaschopné), tzn. teplotu, živiny a okolní vzduch.

Kultivace buněk se provádí ve flow-boxu (Obr. 35), ve sterilních kultivačních panelech s různým počtem jamek v závislosti na počtu buněk, které jsou k dispozici. Kultivační panel s buňkami je umístěn v inkubátoru zajišťujícím stálé inkubační podmínky – teplotu 37 °C a 5% CO₂ atmosféra.

Živiny jsou buňkám dodávány v kultivačním médiu, které se připraví smícháním 32 ml základního média, 3,6 ml FBS (fetální bovinní sérum) jako zdroj bílkovin a 720 μ l PEN/STR (penicilin streptomycin) na prevenci před infekcí. Výměna média se provádí každých 48 hod ve flow-boxu za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci buněčných kultur. Během kultivace MSCs adherují na dno kultivační jamky. Při nadměrné konfluenci nemají tyto buňky na dně jamky prostor a mají tendenci se deadherovat. To způsobí jejich buněčnou smrt. Aby se tomu předešlo, provádí se pravidelné kontroly pomocí světelného mikroskopu (Olympus IX70). Po zjištění vysoké proliferace následuje pasážování (trypsinizace) buněk.

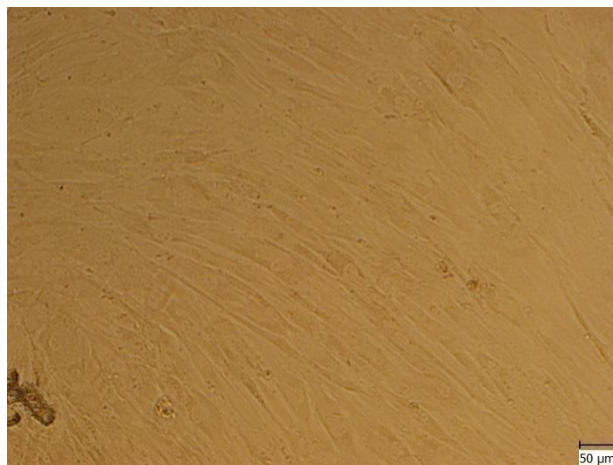


Obrázek 35: Manipulace s buňkami ve sterilním prostředí flow-boxu

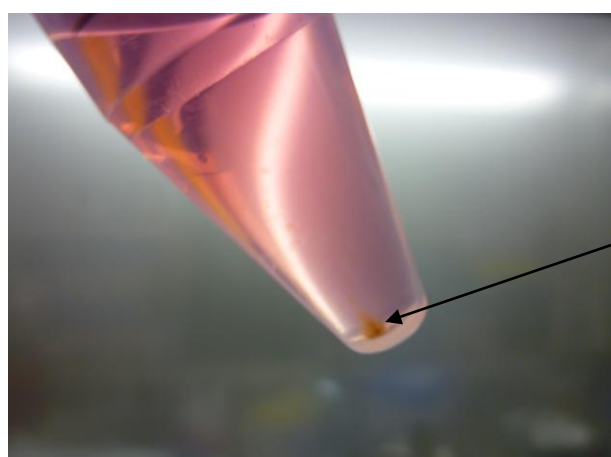
3.1.2 Pasážování MSCs

Cílem pasážování je rozsazení nahuštěné buněčné kultury do více jamek, abychom předcházeli buněčné inhibici při vysoké konfluenci (Obr. 36) a umožnili další konfluenci buněk. Pasážování se provádí ve sterilním flow-boxu. Z jamek se odpipetuje médium, buňky se promyjí fosfátovým pufrem (PBS) a následně se dávkuje trypsin zahřátý na 37 °C ve dvou dávkách po 70 μ l. Působením enzymatického trypsinu buňky deadherují ze dna kultivační jamky. Tato reakce se pozastaví po 8 minutách přidáním kultivačního média. Všechn roztok se odpipetuje do ependorfky a provede se centrifugace při 3500 otáčkách po dobu 5 minut.

Zkontroluje se velikost vzniklého peletu (Obr. 37), odstraní se médium a pelet se rozředí médiem na požadovaný objem. Ten se následně napipetuje do jednotlivých jamek, kde buňky opět adherují na dno jamky a mohou dále proliferovat.



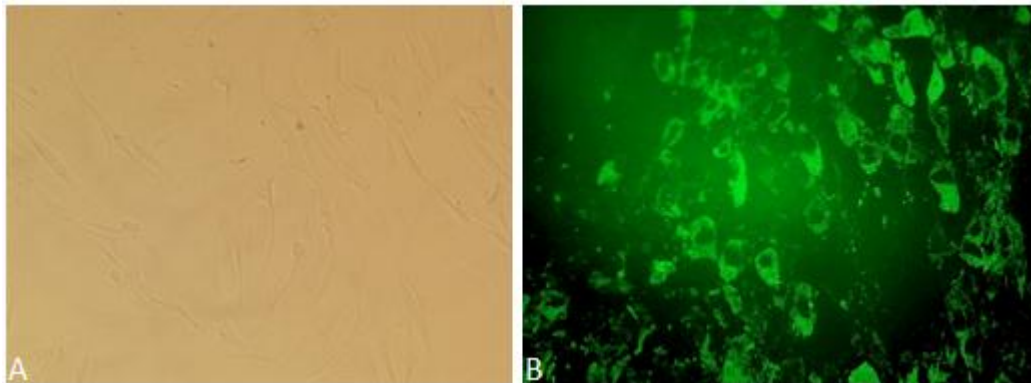
Obrázek 36: hMSCs 100% konfluence



Pelet buněk
s nanočásticemi
smAM

Obrázek 37: Shluk buněk tzv. pelet, který vznikl po centrifugaci. Oranžové zbarvení díky přítomnosti nanočástic smAM

Přítomnost buněk a jejich morfologii lze lépe sledovat fluorescenčním mikroskopem za použití fluorescenčního barviva kalceinu (Ex / Em = 494 nm / 517 nm), který proniká do cytoskeletu viabilních buněk. Po dopadu světla o kratší vlnové délce na chemickou látku (kalcein) dochází k vyzáření světla o delší vlnové délce. Pod mikroskopem jsou pak vidět živé buňky zeleně svítící (Obr. 38b). Tvary buněk jsou na zřetelnější než u zobrazování samotným světelným mikroskopem (Obr. 38a).



Obrázek 38: Vizuální porovnání neznačených mezenchymálních kmenových buněk (hMSC): A) zobrazené světelným mikroskopem Olympus IX70, B) zachycené ve fluorescenčním módu. Zřetelně jsou vidět tvary buněk díky obarvenému cytoskeletu rýsující se kolem tmavých jader.

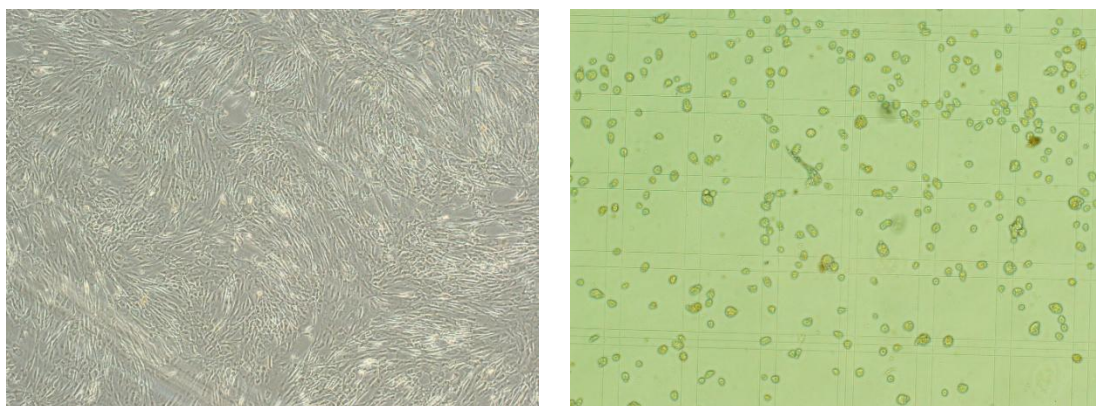
3.2 Stanovení koncentrace buněk

3.2.1 Bürkerova komůrka

Jedná se o ruční počítání v kalibrované komůrce pod světelným mikroskopem (Olympus IX70). Připraví se Bürkerova komůrka, jejíž krycí sklíčko se umístí na počítací povrch ještě před nanesením buněčné suspenze. Ve falkonce je po centrifugaci připraven roztok média s peletem buněk hMSCs, které chceme počítat. Roztok se naředí do 1ml a musí se pipetou řádně rozsuspendovat pro odběr dostatečného množství buněk, které se pak na sklíčku rovnoměrně nanese. Suspenze se nabere pipetou a nanese z obou stran po 10 μ l do V-tvarované prohlubně uprostřed. Vlivem vzlínivosti roztok zaplní celou střední část komůrky. Naplněná počítací komůrka se přemístí pod světelný mikroskop se zvětšením 20 a počítací mřížka se umístí do ohniska. Během počítání je nezbytná opatrnost při manipulaci s komůrkou. Může dojít k posunu buněk a tím ke změně našeho výsledného počtu.

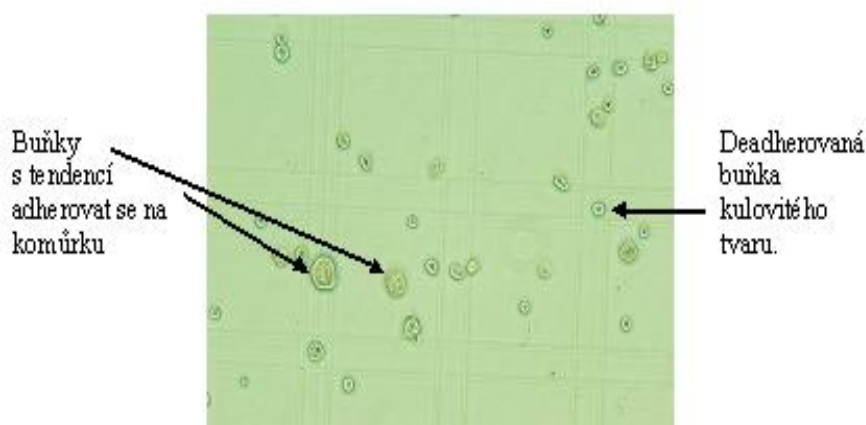
Abychom okem získali odhad počtu buněk v kultivační jamce ještě před použitím Bürkerovy komůrky, porovnali jsme jejich konfluenci v jamce s množstvím buněk v počítací komůrce (Obr. 39). Počítací metodou 2, která byla zmíněna dříve v

kapitole „Metody stanovení počtu buněk“ (2.7.3. na str. 43), se stanovil počet buněk na zorných polích na 980 000 na 1 ml.



Obrázek 39: Znatelně vysoká konfluence adherovaných hMSC značených SPIO nanočásticemi smAM (levý snímek, objektiv 4), která se na Bürkerově komůrce projevila přítomností velkého množství deadherovaných buněk se zakulaceným tvarem (pravý snímek, objektiv 10)

Při počítání je důležité dbát na opatrnou manipulaci s počítací komůrkou. Už jen jemným pohybem může dojít k posunu buněk v komůrkách a tím negativně ovlivnit naše výsledky. Také rychlost počítání by se neměla opomenout, aby nedocházelo k adhezaci buněk na komůrku. Buňky se při tom zvětšují a mění svůj tvar (Obr. 40).



Obrázek 40: Ukázka buněk v Bürkerově komůrce. Zakulacený tvar buněk, které nejsou přichycené ke dnu. Buňky, které se začínají adherovat, mění svůj tvar, jsou na první pohled větší

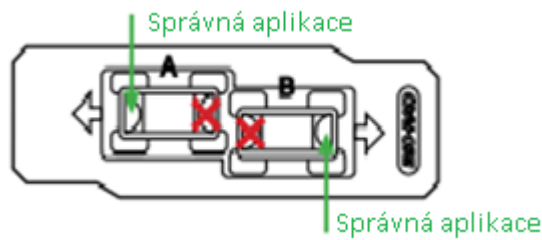
3.2.2 Bio-rad TC10™

Pro účely zrychlení počítání buněk vzhledem k velkému počtu vzorků a opakování pokusů s buněčnými kulturami byl pořízen přístroj Bio-rad TC10™ (Obr. 41).

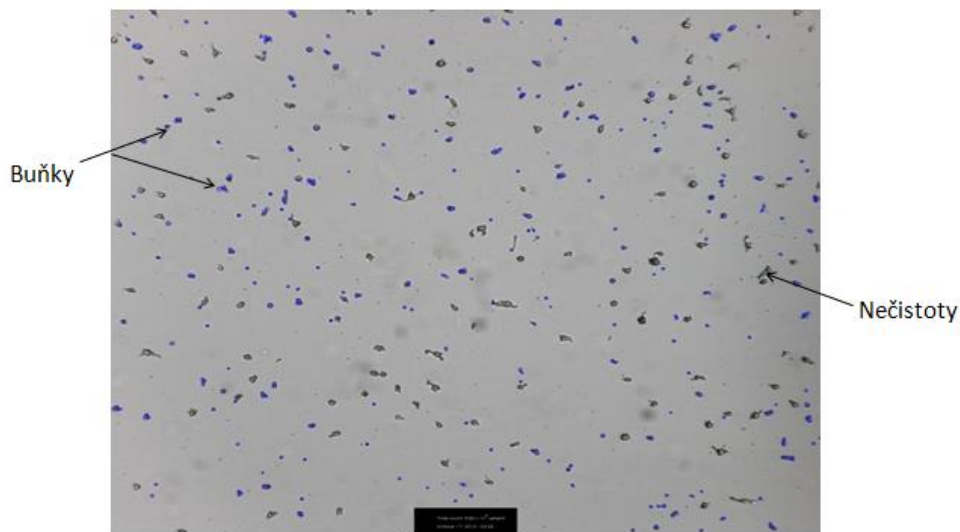
Před samotným počítáním je potřeba eliminovat shluky buněk. Proto je nutné suspenzi dobře promíchat opětovným nasáváním a vypouštěním pipety (cca 5 – 10x). Z řádně rozsuspendované zkumavky se pipetou nabere 10 ul suspenze a aplikuje se z jedné strany počítacího sklíčka pod úhlem 45 stupňů. Je třeba aplikovat takové množství vzorku, aby se komůrka správně naplnila, roztok nesmí přetékat do zadních žlábků (Obr. 42). Sklíčko se vloží do slide-portu počítacího přístroje a do 15 vteřin se zobrazí na displeji výsledek – koncentrace buněk na 1 ml. Naše zjištěná koncentrace se pohybovala v rozmezí 1×10^5 až $1,5 \times 10^6$ buněk/ml (Obr. 43).



Obrázek 41: Bio-Rad TC10™



Obrázek 42: Multifokální počítací destička. Znázornění správné a nesprávné aplikace



Obrázek 43: Přístroj Bio-Rad TC10^{MT} počítá buňky o koncentraci v rozmezí od 5×10^4 – 1×10^7 buněk. Aktuální obrázek znázorňuje koncentraci $8,85 \times 10^5$

Porovnáme-li obě zmíněné metody, zjistíme, že při použití Bürkerovy komůrky je větší pravděpodobnost, že dojde ke zkreslení výsledků. Jakýkoli pohyb způsobí posun buněk v komůrkách a tím se může získat jiný počet než původní. Ve srovnání s přístrojem Bio-Rad TC10^{MT} se jedná o relativně dlouhý proces během počítání. Proto jsme se rozhodli během následujících experimentů použít přístroj Bio-Rad TC10^{MT}, se kterým je manipulace znatelně rychlejší a časová prodleva mezi jednotlivým měřením každého vzorku kratší.

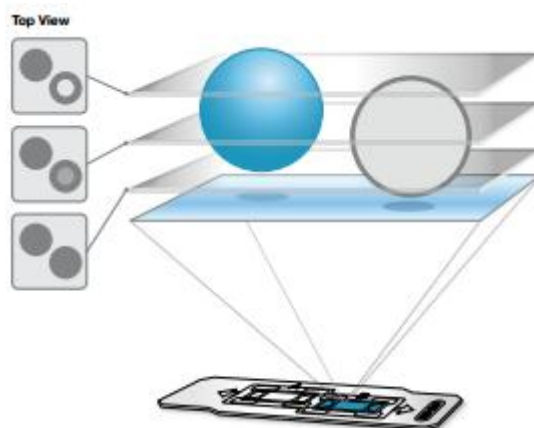
3.3 Zjištění viability buněk

Viabilita buněk se dá stanovit dvěma na sobě nezávislými metodami – Barvení trypanovou modří a MTT testem.

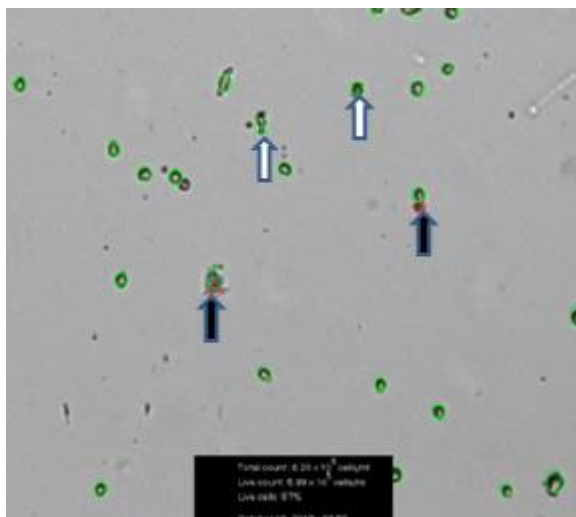
3.3.1 Trypanová modř

S použitím Bio-Rad TC10^{MT}

K relativně rychlému stanovení viability buněk pomocí Bio-Rad přístroje lze použít trypanovou modř a multifokální počítačící destičku (Obr. 44). Před vložením vzorku do počítačící destičky se smíchá buněčná suspenze s 0,5 % roztokem trypanovy modře v poměru 1:1. Po 10 minutách se odebere 10 ul, naaplikuje se na sklíčko a vloží do počítačícího zařízení Bio-Rad TC10^{MT}. Na displeji se zobrazí celkový počet buněk na 1 ml a počet živých buněk na 1ml, vše uvedeno v procentech. Vizualní hodnocení přítomných buněk je znázorněn na obr. 45.



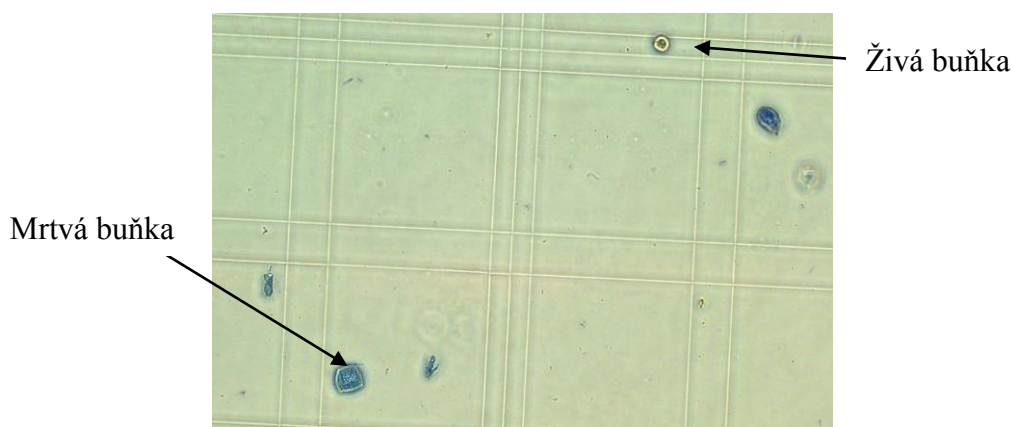
Obrázek 44: Schéma analýzy multifokální počítačící destičky. Pohled shora na dvě buňky je znázorněn na levých obrázcích. Modře zbarvená znázorňuje mrtvou buňku, nezbarvená živou [86]



Obrázek 45: Hodnocení viability buněk pomocí trypanové modře a Bio-Rad TC10^{MT}. Zelené značení u živých buněk, červené jsou mrtvé buňky. Viabilita 97%

S použitím Bürkerovi komůrky

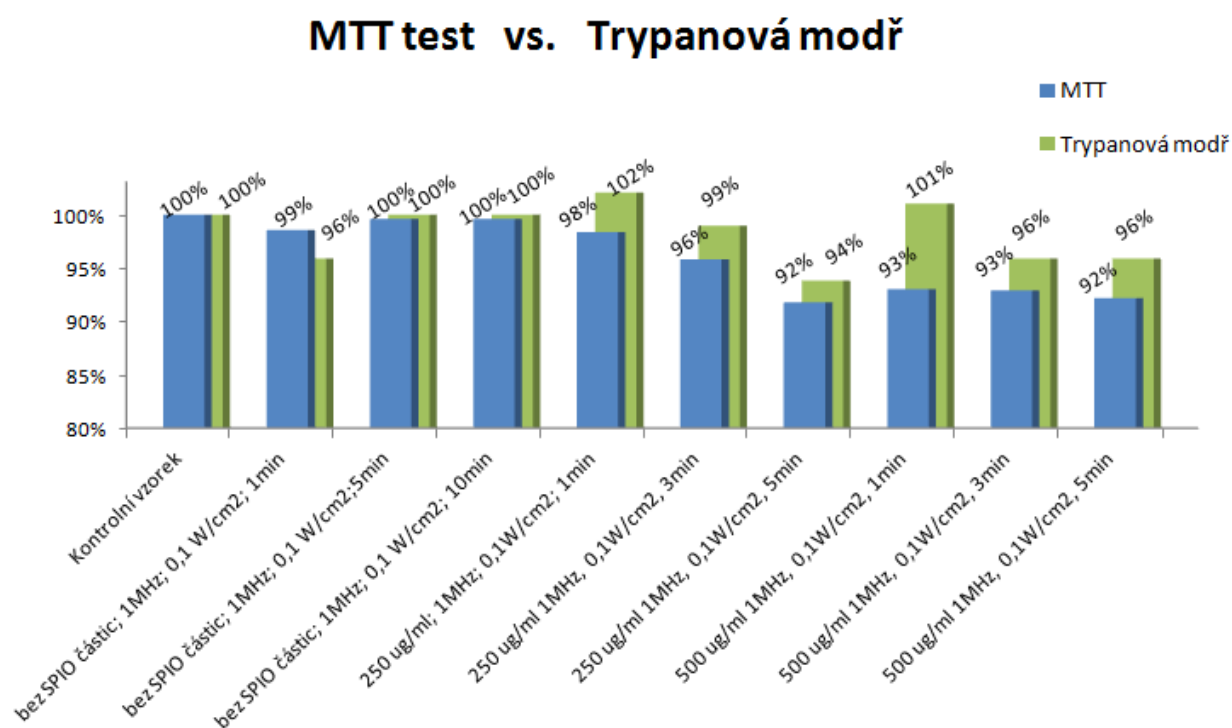
Aplikovalo se 10 μ l trypanové modře na 100 μ l buněčné suspenze. Během 5 minut se barvivo dostalo přes narušenou buněčnou membránu mrtvých buněk. Pod světelným mikroskopem se počítají zvlášť živé (bezbarvé) a mrtvé (modré) buňky (Obr. 46).



Obrázek 46: Pohled na modře zbarvené mrtvé buňky v Bürkerově komůrce

3.3.2 MTT test

Buněčná kolonie fibroblastů je rozdělena do 5 skupin: A, B, C, D a E, která je kontrolní skupinou. Po sonoporaci se tyto vzorky připraví na MTT test odstraněním média, přidáním 50 ul roztoku MTT a inkubuje se 3,5 hod. Poté se roztok MMT odlije, přidá se 100 ul DMSO a nechá se 5 min na třepačce. Měří se absorbance při 570 nm a 690 nm.

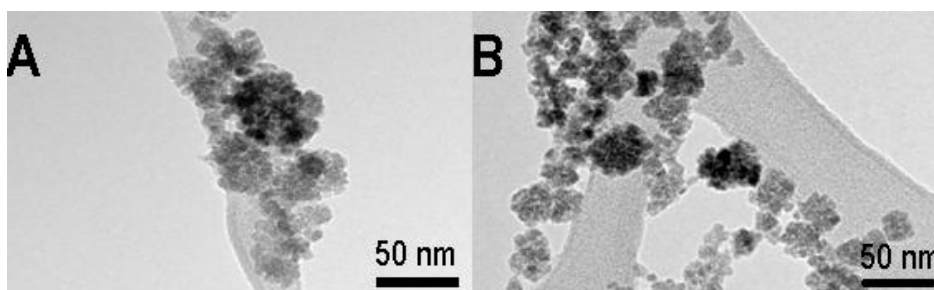


Obrázek 47: Porovnání metod MTT a trypanové modři

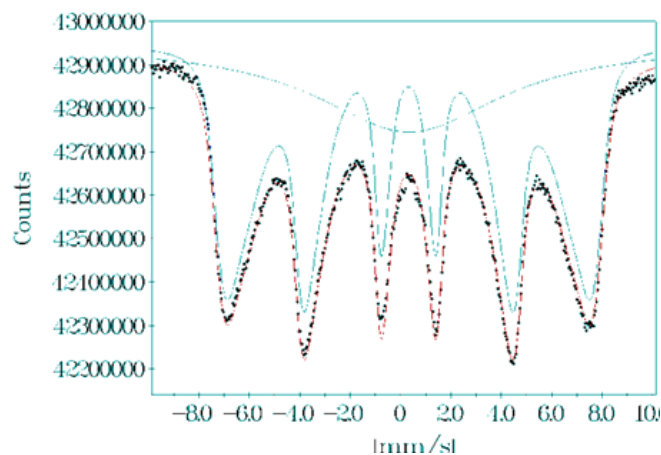
V grafu (Obr. 47) si můžeme všimnout, že trypanová modř udává v průměru o 2% vyšší hodnotu než metoda MTT. Výsledky obou metod jsou srovnatelné, korelují spolu. Větší rozdíly nastávají u vzorků, kde jsou přítomné SPIO nanočástice.

3.4 Vlastnosti superparamagnetických nanočástic smAM

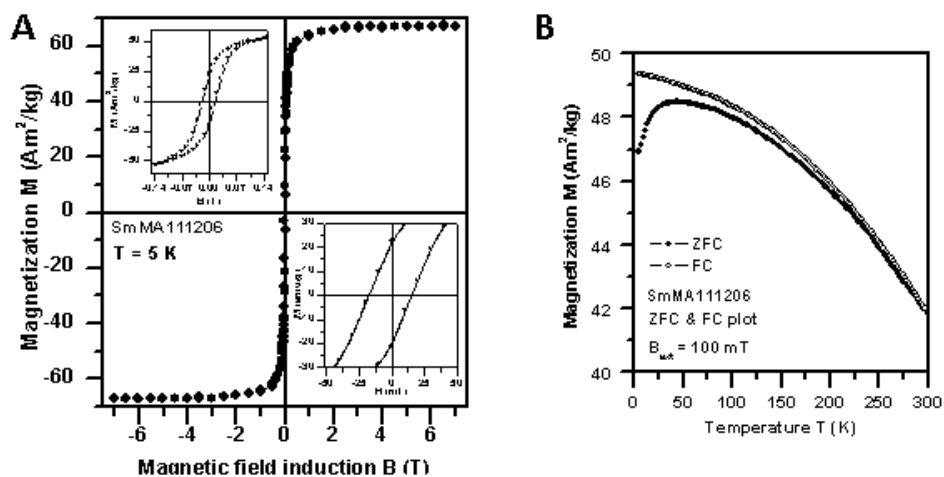
Superparamagnetické nanočástice oxidu železa byly připraveny v laboratoři RCPTM Mgr. Zdeňkou Markovou. Jedná se o nanočástice maghemitu (γ -Fe₂O₃) připravené z prekursoru síranu železnatého (FeSO₄) termicky indukovanou reakcí ve vodné fázi v přítomnosti polymeru poly(acrylic-co-maleic) acid. Tento polymer má několik výhodných vlastností. Zamezí shlukování magnetických částic při nukleaci a růstu krystalů během syntézy a má volné funkční karboxylové skupiny s negativním nábojem. Z TEM snímků (Obr. 48) je patrné, že velikost jednotlivých částic se pohybuje kolem 20 nm a tvoří pravidelné aglomeráty ve tvaru „kyticěk“ o velikosti 50 až 100 nm. Mössbauerovo spektrum vzorku (Obr. 49) je tvořeno jedním sextetem s hyperjemnými parametry odpovídajícími nanočásticím maghemitu, které se nachází v těsné blízkosti blokovací teploty T_B, tzn. mezi uspořádaným ferimagnetickým stavem a superparamagnetickým stavem. Hysterezní smyčka měřená metodou SQUID (Obr. 50) potvrzuje superparamagnetické chování při teplotě 5K. Saturační magnetizace přesahuje 60 emu/g.



Obrázek 48: TEM snímky nanočástic smAM



Obrázek 49: Mössbauerovské spektrum smAM nanočástic měřené při pokojové teplotě



Obrázek 50: a) Hysterezní smyčka nanočástic smAM v poli 5K, b) ZFC a FC křivka nanočástic smAM; měřené metodou SQUID

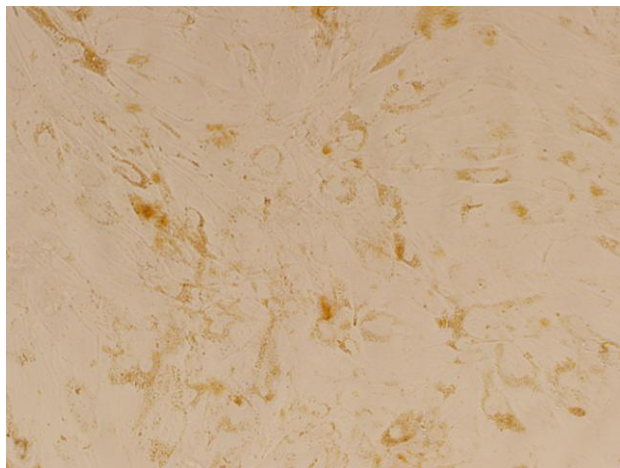
3.5 Metody značení buněk SPIO nanočásticemi

Mezenchymální kmenové buňky a posléze i fibroblasty byly značeny sonoporací využitím terapeutického ultrazvuku za účelem urychlení značícího procesu. Pro kontrolu účinnosti sonoporace byly buňky také inkubovány standardní

cestou a to přidáním SPIO částic do kultivačních jamek při výměně kultivačního média.

3.5.1 Inkubace

Ke značení kmenových buněk se použily SPIO nanočástice smAM, popsané výše, připravené v původní koncentraci 3,5 mg Fe₂O₃/ml. Do kultivačního média kmenových buněk MSCs byly přidány SPIO částice, naředěny tak, aby výsledná koncentrace na jamku byla 25 µg Fe na ml média. Po 24 hodinové inkubaci nanočástic s buněčnou kulturou a po výměně média byly pod světelným mikroskopem jasně pozorovatelné nanočástice v intracelulárním prostoru buněk (Obr. 51).



Obrázek 51: Přítomnost nanočástic smAm v buňkách po 24 h inkubaci; pozn.: hnědo-oranžová barva představuje nanočástice internalizované do perinukleárního prostoru buněk

3.5.2 Sonoporace

Metoda značení pomocí ultrazvuku je založena na využití ultrazvukových vln, které dočasně narušují stabilitu buněčné membrány, což umožní v krátký časový

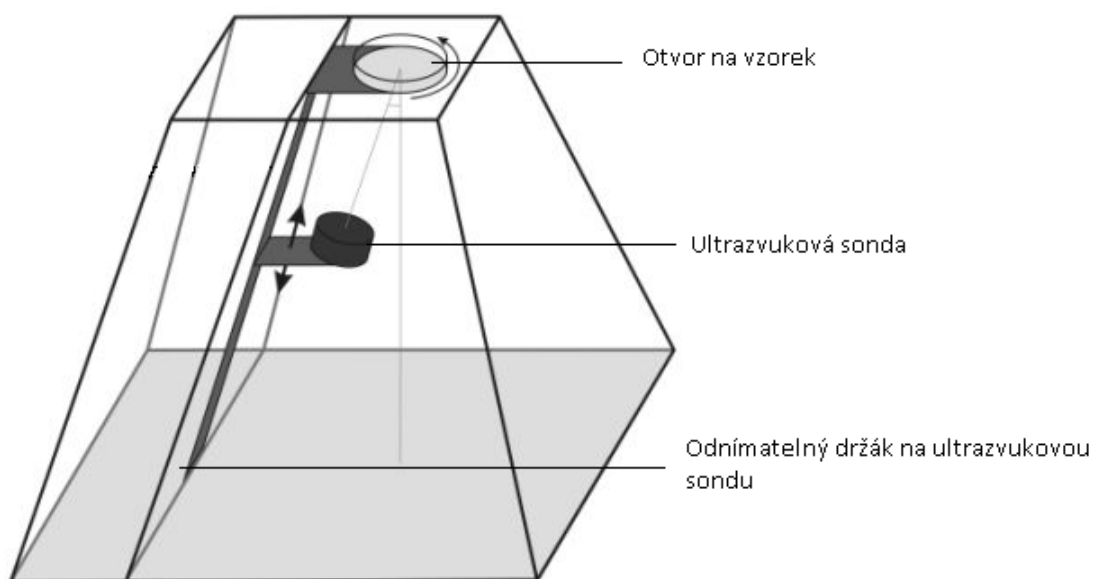
interval průnik nanočástic do intracelulárního prostoru buňky (viz kapitola 2.7.2.1. Ultrazvuk, str. 28).

Pro experiment jsme použili terapeutický ultrazvuk (BTL 4000, USA) (Obr. 52). Energie ultrazvuku byla předem kalibrovaná výrobcem a výsledky z přístroje byly hlídány výstupním kontrolorem. Přístroj vysílá sinusoidální radiofrekvenční signál příslušné intenzity, frekvence a daného expozičního času. Rezonanční frekvence ultrazvukového přístroje je nastavitelná na hodnoty 1MHz a 3 MHz. Maximální výkon je 3 W/cm^2 v pulzním režimu a 2 W/cm^2 v kontinuálním režimu.

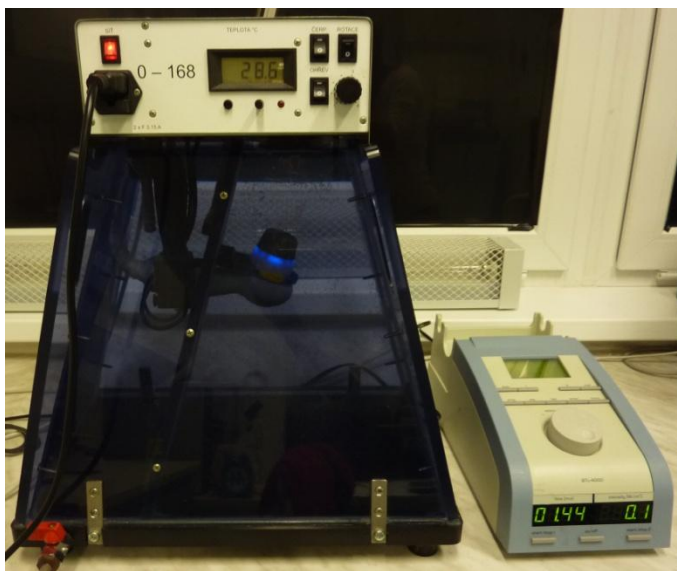


Obrázek 52: Ultrazvukový přístroj BTL 4000, USA. Na obrázku je vidět digitální displej pro nastavení požadovaných hodnot. Při ukončení ozvučení vydá přístroj zvukové upozornění a vypne se [87]

Ultrazvukové expoziční schéma a jeho systém je znázorněn na obr. 53 a obr. 54. Ozvučovací zařízení je tvořeno z průhledné nádoby vyplněné vodou po její horní okraj. Součástí je násadná hlavice, která spouští ohřívání vody, dále držák na zkumavku s pozorovaným vzorkem (Obr. 55). Voděodolná ergonomicky tvarovaná ultrazvuková sonda je při expozici umístěna na držák ve vodní lázni v 1/3 výšky tohoto zařízení. Vzdálenost ultrazvukové sondy od ohniska je 7,2 cm. Polypropylenová zkumavka, do které se aplikuje zkoumaný vzorek má průměr 10 mm a délku 50 mm.



Obrázek 53: Schéma ozvučovacího přístroje používaného při značení buněk v ultrasonografii



Obrázek 54: Ozvučovací přístroj s ultrazvukovou sondou v aktivním režimu, která míří do ohniska vzorku



Obrázek 55: Odnímatelný držák na ependorfkou se vzorkem

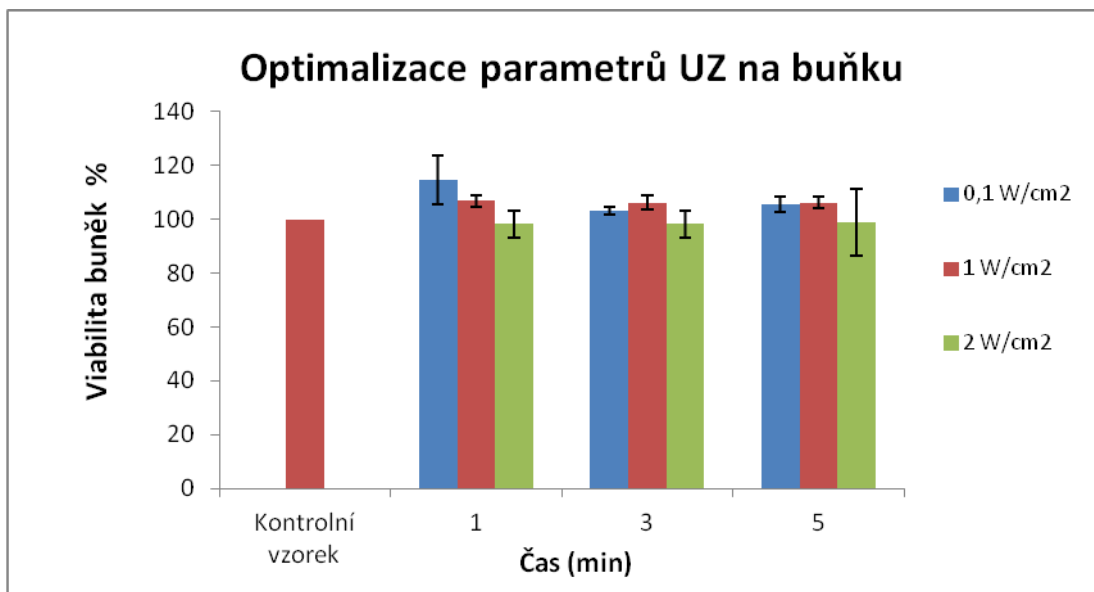
Optimalizace parametrů ultrazvuku (BTL 4000, USA)

Základem pro správné využití ultrazvukového přístroje během značení buněk je najít optimální parametry, které budou mít minimální vliv na viabilitu a proliferaci buněk, ale zároveň zvýší efektivitu značení. Bylo tedy nutné nejprve vysledovat, jak se chovají buňky po terapii ultrazvukem bez SPIO nanočástic.

Buněčná linie fibroblastů s počtem $1-6 \times 10^5$ /ml byla pěstována za standardních podmínek v živném médiu s fetálním bovinním sérem a antibiotiky (penicilin, streptomycin) v termostatu při 37 °C, vzdušné vlhkosti 95% a 5% CO₂.

Buňky rostoucí přisedlé na dně jamky se v den experimentu pasážují. Nejprve se z jamek odpipetuje médium a dvakrát se promyjí 37 °C roztokem PBS. Poté jsou uvolněny ode dna kultivační jamky roztokem trypsin EDTA, kterého se aplikuje 210 ul na jamku a nechá se působit asi 5 minut v termostatu. Buňky v každé jamce se mohou deadherovat různě rychle, proto je nutné je sledovat i přes mikroskop, aby nedošlo ke ztrátám. Po uvolnění buněk se přidá médium za účelem zastavení působení enzymů. Buněčná suspenze každé jamky se odsaje pipetou do zkumavek. Proveďte se proplach vychlazeným PBS, aby se zbývající buňky uvolnily, a přidáme do příslušné zkumavky. Zkumavky s buněčným supernatantem se vloží do centrifugy na 4 min nastavené na 1500 otáček při pokojové teplotě. Vzniklé pelety ponecháme ve zkumavce, vše ostatní se odsaje, přidá se nové médium do objemu 1 ml. Buněčné pelety se rozsuspendují v každé zkumavce zvlášť a vloží se do vodní lázně uchycením v držáku. Poté je každý vzorek ozvučen ultrazvukovým přístrojem o různých intenzitách a při odlišných expozičních časech ale vždy o frekvenci 1 MHz.

Právě veličiny jako jsou frekvence, intenzita ultrazvukového vlnění a doba expozice určují míru biologických účinků ozařovaných buněk. Sledovaly se morfologické změny, viabilita a proliferace. Zjišťovaly se podmínky, kdy je ultrazvuková aplikace pro buňky nejméně agresivní.



Obrázek 56: Optimalizace parametrů ultrazvuku (doba expozice a výkon) na buňku

Z grafu (Obr. 56) vyčteme, že intenzita do 1 W/cm^2 má vzhledem ke kontrolnímu vzorku spíše biostimulační efekt. 2 W/cm^2 se už projevilo úbytkem životnosti. Použité expoziční časy neměly zásadní vliv na viabilitu buněk. Dá se předpokládat, že viabilita bude s rostoucím expozičním časem dále klesat. Obecně se dá říct, že čím vyšší intenzita ultrazvukového vlnění na buňky dopadá, tím větší destrukce u těchto buněk nastane.

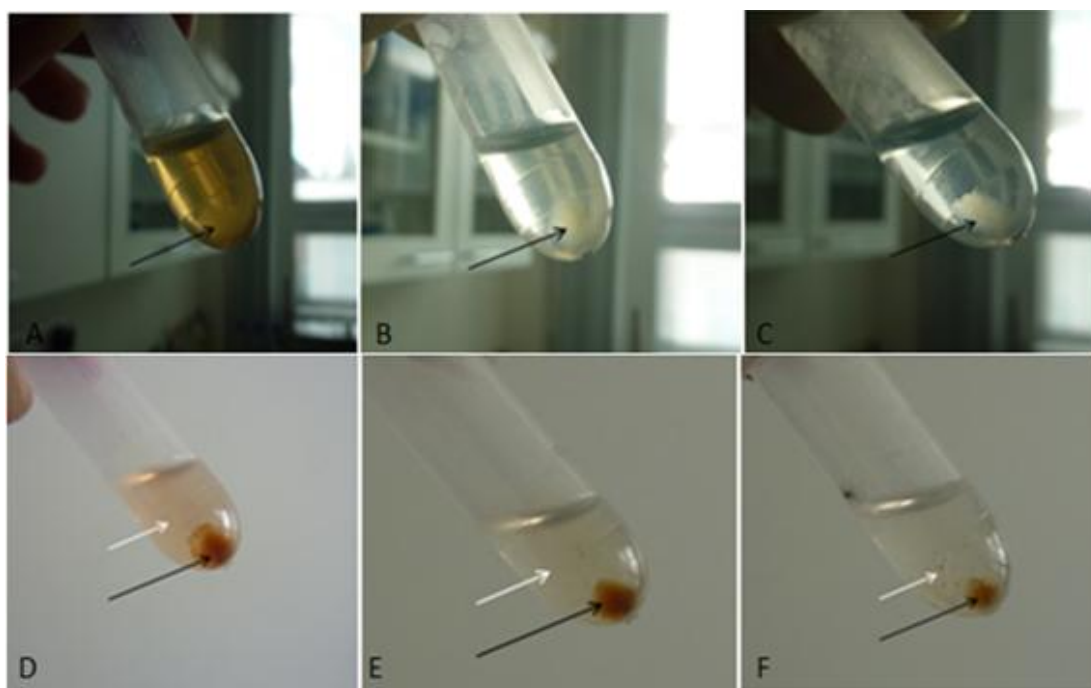
3.5.3 Značení ultrazvukem

Příprava vzorku pro značení buněk nanočásticemi smAM pomocí ultrazvuku bylo popsáno v kapitole „Optimalizace parametrů ultrazvuku (BTL 4000, USA)“ (str 63). Do jednotlivých zkumavek s buňkami se poté aplikuje stanovené množství nanočástic smAM.

Připravilo se tak celkem 7 skupin pro tuto studii: A – vzorek bez přítomnosti smAM nanočástic; B_a – buněčná suspenze značená nanočásticemi smAM o koncentraci 250ug/ml na expoziční dobu 1 min; B_b – smAm 250 ug/ml, 3 min; B_c –

smAm 250 ug/ml, 5 min; C_a – smAM 500 ug/ml, 1 min; C_b – smAM 500 ug/ml, 3 min; C_c – smAM 500 ug/ml, 5 min. Na vzorky byla aplikována intenzita 0,1 W/cm².

Vzorek se rozsuspenduje, pro zvýšení účinnosti se zvortexuje a poté vloží do vodní lázně uchycením v držáku. Po ultrazvukovém ozvučení každého vzorku (B_a - C_c) byly poté vzorky stočeny na centrifuze. Supernatant se odlije a buněčný pelet (sediment) se propláchně použitím PBS. Poté je vzorek řádně promíchán, aby došlo k odstranění případných smAM částic přichycených centrifugací pouze na buněčném povrchu. Následně jsou vzorky opět stočeny centrifugací tentokrát při teplotě 6°C. Tento proces je opakován 4x. Tímto postupem získáme pelet buněk pouze s smAM částicemi, které během sonografického ozvučení pronikly do intracelulárních prostorů buněk (Obr. 57).



Obrázek 57: Vzorky s viditelným peletem vzniklé po centrifugaci po 2., 3. a 4. stočení. A – C: buněčný pelet bez přítomnosti smAM nanočástic (černé šipky). D – F: smAm nanočástice v buněčném peletu (černé šipky) a postupné odstraňování přebytečných smAM (bílé šipky).

3.6 Stanovení množství Fe na buňku

3.6.1 Kvantitativní stanovení - AAS

Metoda AAS umožňující na základě měření pohlcování světla určit koncentraci železa v našem vzorku. Vzorky je nutné předem povařit v HNO_3 při 100°C zhruba 20 min. Následně se zředí destilovanou vodou do 5 ml a pomocí atomového absorpčního spektrometru získáme výsledné množství přítomného železa v každém vzorku v jednotkách mg/l.

3.6.2 Kvalitativní stanovení - pruská modř

Množství nanočástic internalizovaných v intracelulárním prostoru buňky je možné sledovat po aplikaci pruské modři ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]_3$) do suspenze buněk s nanočásticemi [88]. Výhodou je rychlost zjištění stavu buňky po téměř okamžitém obarvení. Tato metoda umožňuje vizuálně stanovit přítomnost železa (zde ve formě SPIO nanočástic) uvnitř buněk, na rozdíl od železa plovoucího v buněčném médiu či naadsorbovaného na povrchu buněk.

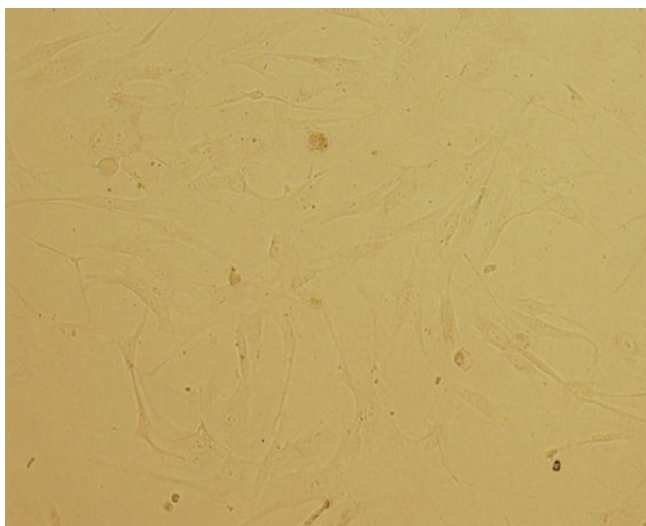
3.7 VÝSLEDKY

3.7.1 Interakce smAM nanočástic s buňkami během značení pasivní inkubací

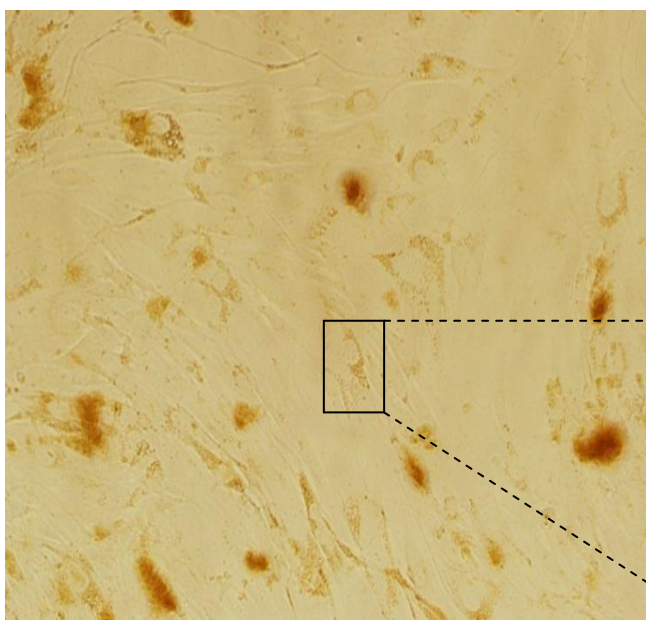
Během in vitro studií byly sledovány nejprve interakce nanočástic s kmenovými buňkami (Obr. 58). Protože ale bylo zapotřebí pro experimenty s ultrazvukem velké množství buněk, rozhodli jsme se pracovat s častěji se vyskytující buněčnou linií fibroblastů. Ty se na rozdíl od kmenových buněk lépe izolují a častěji dělí. Oba dva typy buněk, jak kmenové tak fibroblasty, patří mezi buňky nefagocytující, které jsou adherentní a tvoří monovrstvu.

Důležitou vlastností nanočástic, vhodných pro značení buněk, je jejich biokompatibilita a netoxický charakter. Biokompatibilní obal nanočástice smAM, který zajišťuje jeho stabilitu je tvořený z kyseliny polyakrylové-maleinové. Do kultivačního média kmenových buněk byla přidána suspenze nanočástic smAM o koncentraci 25 ug Fe/ml a byla studována morfologie a proliferace buněk po označení.

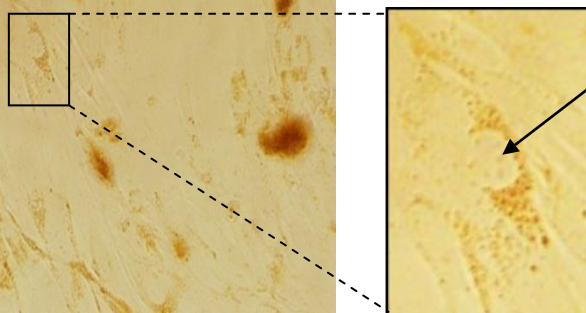
V případě kmenových buněk došlo již po 24 h inkubaci s smAM nanočásticemi k interakci (Obr. 59). Ze snímků světelného mikroskopu je patrné, že pomocí periferních částí buněčného těla dochází k postupné internalizaci nanočástic. V porovnání s obr. 58 buňky po uptaku nanočástic nevykazují žádné morfologické změny. Snímek je mírně rozostřen, protože rovina zaostření buněk je mírně posunuta od roviny zaostření nanočástic. A tak přítomnost nanočástic plovoucích v médiu může komplikovat určení přítomnosti buněk a jejich morfologii. Výměnou média se tyto nedostatky odstraní.



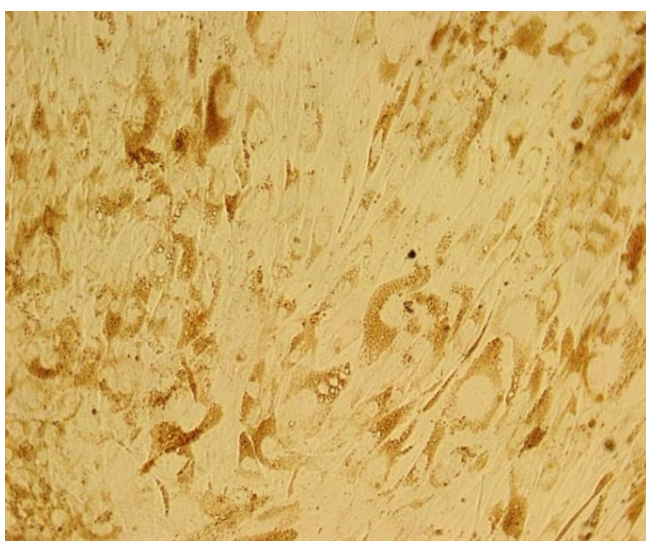
Obrázek 58: hMSC před aplikací nanočástic (objektiv 20)



Obrázek 59: Náznaky inkorporace nanočástic smAM do intracelulárního prostoru buněk. Sledováno po 24h inkubace (objektiv 20)

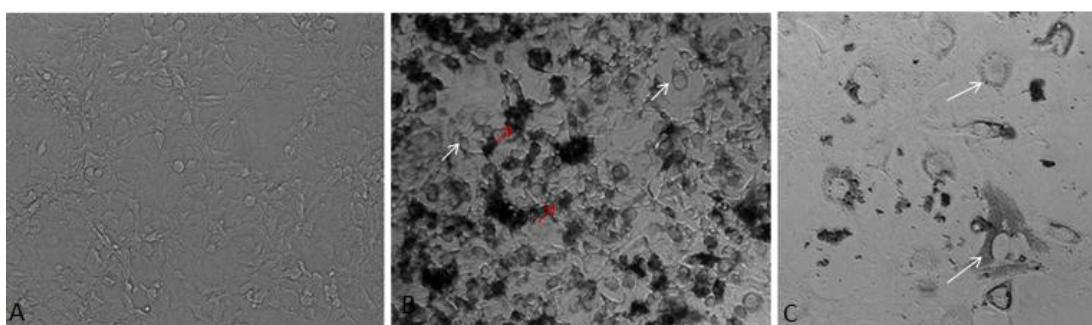


*Jádro s jadérky
Detail buňky s jádrem obklopeným inkorporovanými nanočásticemi*



Obrázek 60: Buňky po 4 dnech od značení nanočásticemi smAM s jasně rozlišitelným buněčným tělem díky internalizaci nanočástic (objektiv 20)

Při práci s fibroblastickými buňkami jsme stanovili pomocí MTT testu toxickou dávku smAM nanočástic, tzv. IC50, která činila 1360 ug/ml. Toto číslo udává koncentraci, která vyvolá 50 % buněčnou smrt. Na základě této hodnoty se následně fibroblastům podávaly tak vysoké koncentrace smAM, které by zároveň neměly negativní vliv na viabilitu buněk. Po aplikaci 500 ug/ml smAM se tato koncentrace nejevila jako toxická. Proliferační schopnost buněk byla podobná kontrolnímu vzorku a buňky taktéž nevykazovaly žádné morfologické změny ani při dlouhodobém pozorování (Obr. 61a, Obr. 61b).



Obrázek 61: A – buněčná kolonie fibroblastů; B – smAM volně plovoucí v kultivačním médiu fibroblastů (červené šipky) a pronikající do intracelulárních prostorů buněk (C) detail (bílé šipky)

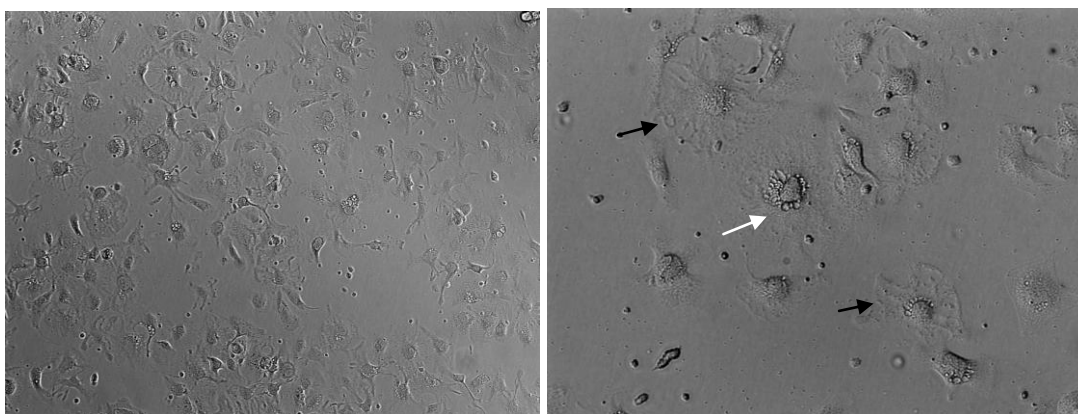
V obou případech, jak u kmenových buněk tak i fibroblastů, se nanočástice soustřeďují spíše kolem jádra a kopírují tvar buňky (Obr. 60, Obr. 61c).

3.7.2 Viabilita buněk po sonoporaci

MTT testem byla také stanovována viabilita buněk po sonoporaci. Optimální expoziční čas byl zvolen 1 minuta, dle výsledků sonoporace neznačených fibroblastů (viz obr. 56 na str. 64). Dalším sledováním těchto buněk během následujících dvou dnů se ukázalo, že jejich viabilita úměrně klesá.

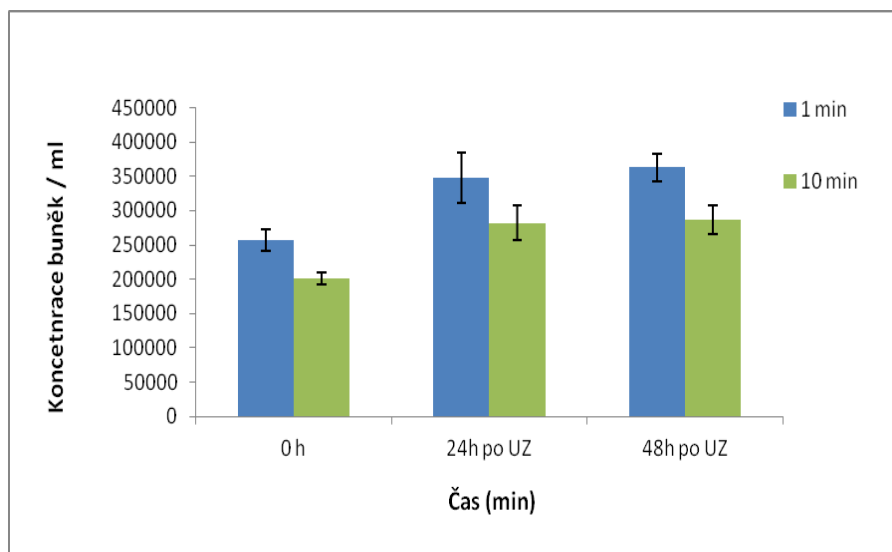
Po sonoporaci došlo vždy ke ztrátám buněk, konfluence tudíž byla výrazně nižší než před sonoporací. Během nasazení fibroblastů zpět do jamek na inkubaci mají totiž

buňky kolem sebe více místa a mohou tak vysílat více filopodii (chapadelek) k uchycení (Obr. 62a). Na obr. 62b si lze povšimnout bílých váčků v okolí jader. Nevylučuje se, že se může jednat o apoptická tělíska, která později vedou k zániku buněk. V tom případě je zajímavé, že se tato tělíska vyskytují pouze v okolí jader a zbytek těla je natažený.



Obrázek 62: Snímky fibroblastů po sonoporaci A) Buňky nasedají po 2 h na dno jamky. Je znát jejich úbytek ve srovnání s kontrolním vzorkem (viz obr. 61a); B) Buňky se na dno přichycují pomocí filopodií (černá šipka). Objevují se pinocytózní tělíska (bílá šipka)

Po sonoporaci fibroblastů se sledovala buněčná proliferace (Obr. 63) po 24 a 48 hodinách. Počet buněk se překvapivě postupně zvyšoval. Může to být způsobené slabými vibracemi, jenž mohou stimulovat jejich růst; tzv. biostimulační efekt ultrazvuku. Dále lze z grafu na obr. 63 vyčíst, že buňky vykazují po delším expozičním čase (10min) vždy nižší proliferaci než po 1 minutové sonoporaci.



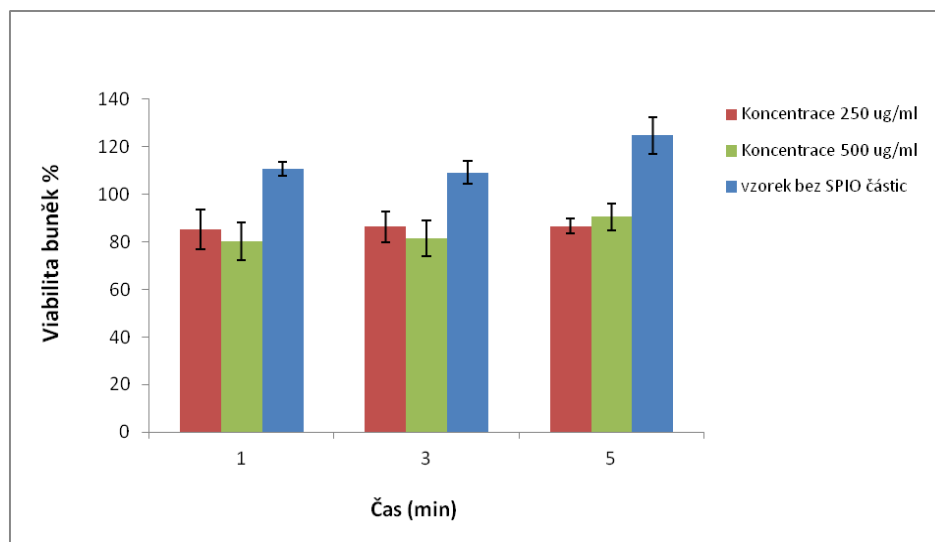
Obrázek 63: Graf znázorňuje průběh proliferace neznačených fibroblastů po sonoporaci

3.7.3 Značení metodou sonoporace

Využití ultrazvukových vln pro značení buněk SPIO nanočásticemi má vést ke zvýšení efektivity značícího procesu především díky kratší době. Naznačené buňky tak lze rychleji použít pro následné in vivo bioaplikace a zamezit tak jejich stárnutí či možné infekci nečistotami v buněčném médiu či při manipulaci. Z výsledků optimalizace ultrazvukového přístroje (viz obr. 56 na str. 64) byla při značení nastavena intenzita $0,1 \text{ W/cm}^2$ a 1 MHz. Platí, čím nižší frekvence se na buňky použije, tím dojde k vyššímu průniku SPIO nanočástic do intracelulárních prostorů buněk.

Do buněčné suspenze fibroblastů byly přidány smAM nanočástice o koncentraci 250 ug/ml a 500 ug/ml. Třetí skupinu tvořily vzorky kontrolní bez přítomnosti smAm. Z obr. 64 je vidět, že u kontrolních buněk se po sonoporaci projevil nárůst viability ve všech třech ozařovacích časech, avšak výrazně vyšší při 5 minutách. Fakt, že dosažené výsledky vychází vždy více než 100% vzhledem ke kontrole, se dalo očekávat. Námi vybrané parametry, jako je intenzita a čas, jsou totiž tak nízké, že to buňky nepoškodí. Takové dávky ultrazvuku mají spíše biostimulační efekt a podporují buňky k růstu. Buňky po označení SPIO částicemi ultrazvukem vykazují viabilitu nižší než ty kontrolní. Pohybuje se kolem 85%. V případě, že výsledky neklesají pod 80%,

neohrožují SPIO nanočástice buňky na životě. Z toho lze učinit závěr, že koncentrace SPIO částic 500ug/ml a použití ultrazvuku (1, 3, 5 min., 0,1 W/cm² a 1 MHz) nemá zásadní vliv na viabilitu fibroblastů.

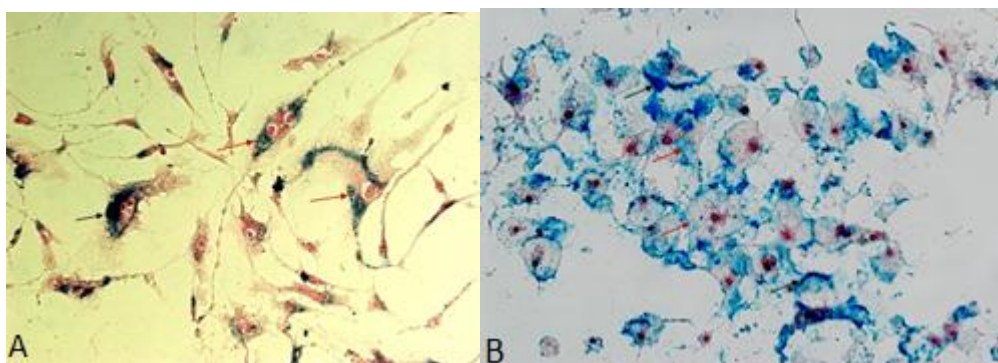


Obrázek 64: Porovnání viability fibroblastů po sonoporaci s a bez SPIO částic, stanovené metodou MTT

3.7.4 Efektivita značení buněk

Po ultrasonografickém ozvučení buněk s přidávanými nanočásticemi smAM byla kvalita značení hodnocena vizuálně pomocí světelného mikroskopu a to barvením železa pruskou modří. Během aplikace této látky došlo na fibroblastech k viditelným morfologickým změnám. Tvar buněk se začíná krabatit a nabývá zakulaceného tvaru (Obr. 65b). Je možné, že se dostávají do stádia, kdy se pomalu deadherují ze dna jamky a odumírají. Ve srovnání s kmenovými buňkami bylo s fibroblasty více manipulováno a to mohlo mít dopad na jejich viabilitu. Modře zbarvené části buněčného těla nám podávají důkaz o přítomnosti železa v buňce a podle sytosti modré barvy lze usuzovat lokalizaci nanočástic (v buňkách nebo na povrchu membrány). Snímek (Obr. 65) nám demonstruje, že v případě fibroblastů se nanočástice vyskytují spíše v periferní části buněčného cytoskeletu (Obr. 65b) na rozdíl od dlouhodobého značení prostou inkubací, kde se částice dostávají spíše do okolí jádra (Obr. 65a).

Toto kvalitativní stanovení efektivity značení je vhodným vizuálním doplňkem k metodě AAS, která nám určuje kvantitativní zastoupení železa ve vzorku. Protože byl znám počet buněk na začátku značícího pokusu, lze z výsledků metody AAS určit množství železa připadající na jednu buňku.



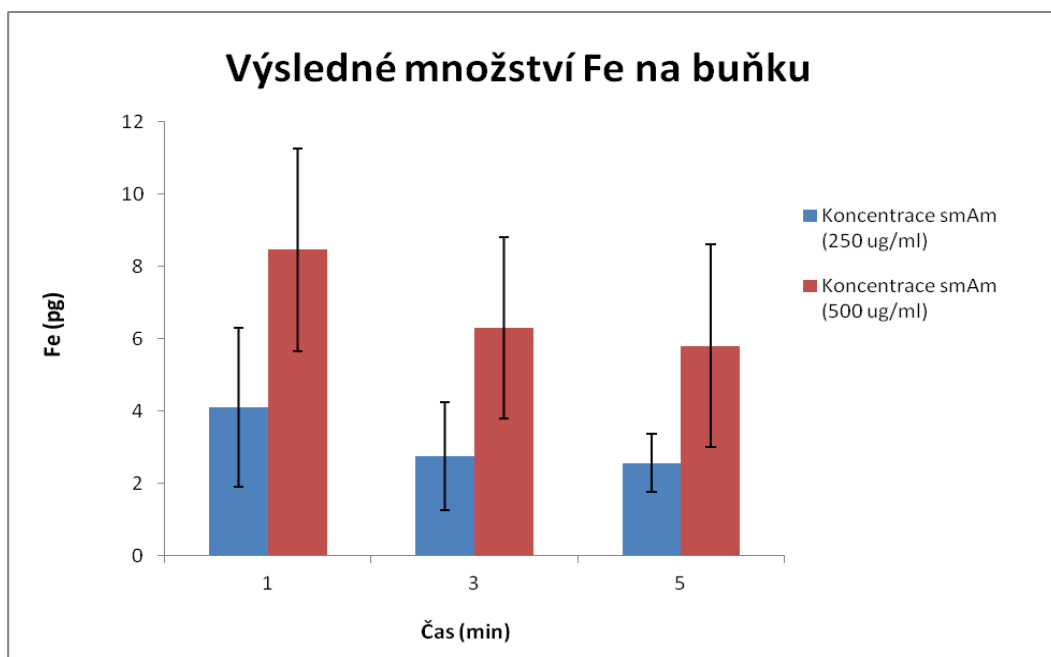
Obrázek 65: Snímky z optického mikroskopu buněk obarvených pruskou modří; (vlevo) kmenové buňky značené SPIO částicemi prostou inkubací, (vpravo) fibroblasty značené SPIO částicemi sonoporací. Černé šipky označují SPIO částice na povrchu buněk, červené šipky uvnitř, červeně jsou obarvená buněčná jádra

Následným přepočtem došlo k vyvrácení naší původní hypotézy, že s rostoucím expozičním časem bude stoupat také množství Fe v buňce. Největší uptake nanočástic smAm nastal vždy během první minuty. Metodou atomové absorpční spektroskopie (AAS) se u vstupní koncentrace 250 ug Fe/ml získala hodnota při ozvučení 1, 3 a 5 min – 4,10; 2,75 a 2,56 pg Fe na buňku. Vyšší uptake nanočástic nastal u koncentrace 500 ug Fe/ml – 8,46; 6,3 a 5,8 pg Fe (Obr. 66).

Z toho vyplývá, že efektivity značení buněk sonoporací je nepřímo úměrná na expozičním čase. Avšak s rostoucí vstupní koncentrací aplikovaných nanočástic roste buněčný uptake. Po podání 500 ug Fe/ml s expozičním časem 1 minuta proniklo do buněk v průměru 8,46 +/- 2,8 pg Fe na jednu buňku. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s výsledky studií Runyang Mo a kol. (2011) [53], ve kterých uvádí množství železa 10,38 +/- 2,43 pg na buňku při výchozí aplikaci 410 ug Fe/ml. V některých studiích se dokonce uvádí hodnoty nad 60 pg na buňku. Výsledky studií však závisí na typu buněk,

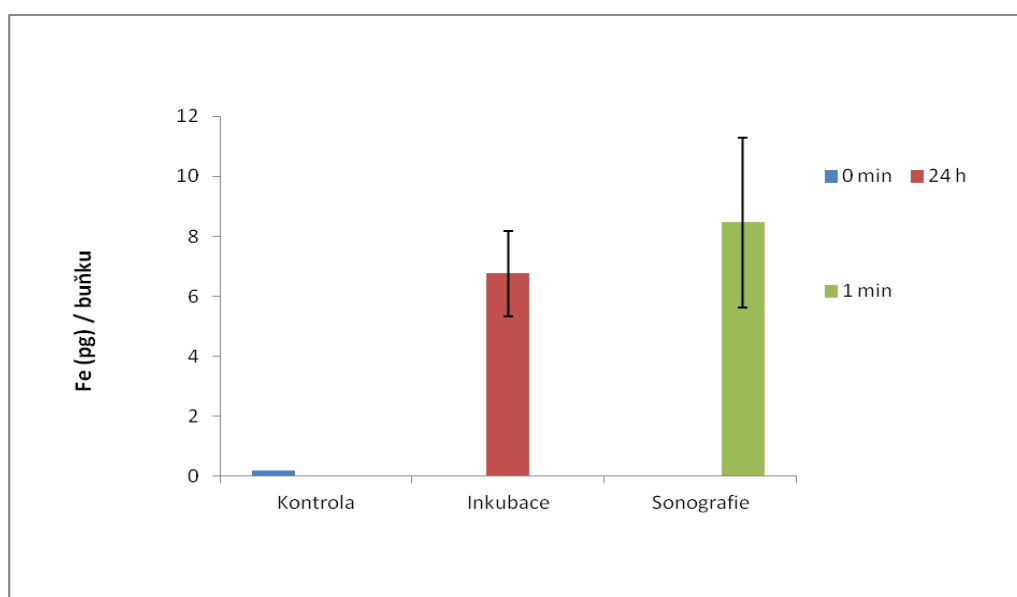
použitých nanočásticích a nastavení ozvučovacího přístroje. Pro srovnání, kontrolní vzorek neznačených buněk má téměř nulovou hodnotu koncentrace Fe.

Postupným zvyšováním expozičního času dochází v našem případě při koncentraci 250 ug/ml i při 500ug/ml ke snížení efektivity značení. Runyang Mo a kol. (2011) [53] uvádí jako možnou příčinu přítomnost ultrazvukových kavitací v kombinaci s plovoucími nanočásticemi, které mohou způsobit apoptózu. Mohlo také dojít k tzv. transcytóze, kdy po delší expoziční době dojde k průniku nanočástic skrz póry přes buňku a během dalších vteřin dojde následně vlivem proudění vody k jejich úniku z pórů z jiné části buňky. Nasycení buňky nanočásticemi je taktéž možným vysvětlením vysokého uptake v první minutě. Naopak výsledky expozičního času se na rozdíl od našich výsledků liší u Yi-Xiang J. Wang a kol. (2010) [61], kde buněčný uptake lineárně roste s expozičním časem [61]. Při experimentech závisí na již zmíněných parametrech jako je frekvence a intenzita ultrazvuku, na typu buněk a použitých SPIO nanočástic.



Obrázek 66: Závislost koncentrace Fe v buňce na expozičním čase pro dvě koncentrace nanočástic smAm (250 a 500 ug/ml); stanovené metodou AAS

Výsledky efektivity značení (množství Fe na buňku) sonoporací byly pomocí metody AAS porovnány se značení pasivní inkubací. Výsledky z grafu (Obr. 67) ukazují, že sonoporací je dosaženo 8,46 pg/buňku, což je hodnota o něco vyšší než množství železa získaného při inkubaci, tj. 6,76 pg/buňku. Tyto závěry se shodují s výsledky Yi-Xiang J.Wang a kol. (2010) [61], který na základě svých studií taktéž prokázal signifikantní efekt ultrazvuku při značení nádorových buněk kostí (osteosarkomů).



Obrázek 67: Porovnání koncentrace Fe/buňku fibroblastů značených sonoporací s metodou standardní inkubace (24hod)

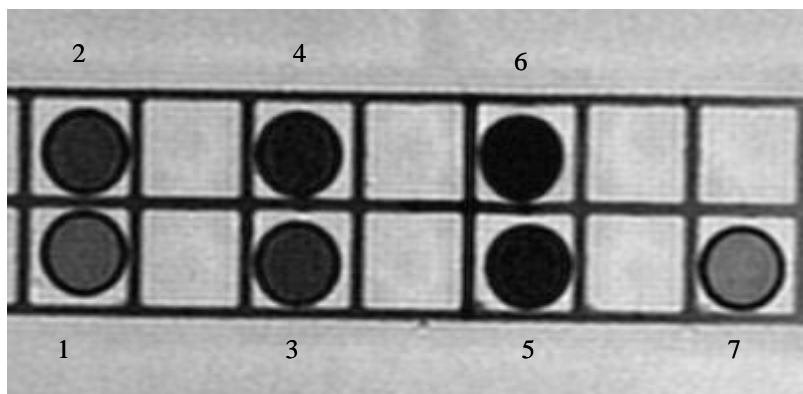
3.7.5 MRI měření negativního kontrastu nanočástic smAM po sonoporaci

Magnetická rezonance (MRI) se svou vysokou rozlišovací schopností a velkým kontrastem při zobrazení měkkých tkání umožňuje monitorovat pohyb kmenových buněk značených SPIO nanočásticemi. Studium interakce buněk s nanočásticemi má velký potenciál v biomedicínských aplikacích a proto je tomuto tématu věnováno velké množství studií. Vhodně zvolenou kontrastní látkou (např. na bázi SPIO nanočástic) může být ovlivněna intenzita signálů zkoumaných oblastí pomocí metody MRI.

Příprava vzorků na MRI a způsob značení je popsán v kapitole 3.5.3 „Značení ultrazvukem“ (str. 65). Byla vytvořena koncentrační řada vstupních SPIO nanočástic při značení sonoporací: $c_1 = 35 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_2 = 100 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_3 = 180 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_4 = 250 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_5 = 500 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_6 = 1000 \mu\text{g Fe/ml}$, $c_7 = 0 \mu\text{g Fe/ml}$. Následně byly připraveny fantomy vzorků buněk po sonoporaci SPIO částicemi této koncentrační řady a to smícháním v 1% agaru. Pomocí klinického 1,5 T MRI se porovnal negativní kontrastní efekt buněk výše zmíněné koncentrační řady.

Těmto koncentracím c_1 až c_7 odpovídá z MRI stupeň šedi (tedy míra negativního kontrastu) 741, 400, 391, 210, 174, 125, 1164 (agar). Na obr. 68 jsou to šedá kolečka (řezy rovin ependorfek obsahujících magneticky označené buňky). Fantom č. 6 obsahující při sonoporaci 1000 ug Fe/ml dosahuje velmi tmavého signálu, je téměř asignální.

S rostoucí koncentrací Fe ve vzorku klesá adekvátně MR signál. Je tedy potvrzeno, že s rostoucí koncentrací Fe při sonoporaci roste jeho obsah v buňce. Tento fakt je potvrzen také metodami AAS a barvením železa pruskou modří.



Obrázek 68: Snímek z MRI ukazuje negativní kontrastní efekt vzorků obsahujících buňky po sonoporaci se SPIO částicemi o různých koncentracích (1 až 7 odpovídá koncentracím c_1 až c_7)

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledování interakce kmenových buněk a fibroblastů s magnetickými nanočásticemi, optimalizace značení metodou sonoporace a stanovení koncentrace železa na jednu buňku. Dále se porovnávala metoda pasivní inkubace nanočástic s buňkami s metodou sonoporace.

Při našich in vitro studiích byly sledovány interakce nanočástic smAM s kmenovými buňkami a fibroblasty. Při inkubaci nanočástic smAM o koncentraci 25 ug Fe/ml kmenové buňky nevykazovaly žádné morfologické změny. Mnohonásobně vyšší koncentrace nanočástic smAM (250 ug Fe/ml a 500 ug Fe/ml) u fibroblastů nevyvolaly při dlouhodobém pozorování (24, 48h) toxické účinky ani morfologické změny. V obou případech se nanočástice soustřeďují kolem jádra a kopírují tvar buňky. Podle výsledku jsou tedy nanočástice smAM vhodné pro značení jak kmenových buněk, tak fibroblastů.

Morfologické změny magneticky značených fibroblastů byly zpozorovány po terapii ultrazvukem – sonoporaci. Během manipulace před, během a po ozvučení vzorků s buněčnou suspenzí se ukázalo, že došlo ke ztrátám buněk. To vedlo k tomu, že při nasedání na dno jamky měly buňky kolem sebe víc místa, což jim umožnilo vysílat více filopodií k uchycení a buněčná těla se tak více rozrůstala do šířky, buňky vytvářely pavučinkový tvary.

Efektivita značení metodou sonoporace je závislá na zvolených parametrech. Jako optimální hodnoty ultrazvukového přístroje pro sonoporaci fibroblastů se jevila intenzita $0,1 \text{ W/cm}^2$, $f = 1 \text{ MHz}$ a čas 1 minuta. Z našich dosažených výsledků vyplývá, že nízká intenzita ultrazvuku nemá na buňky toxický efekt. Vzhledem ke kontrolnímu vzorku naopak nastal růst viability. Čím nižší intenzita je aplikována, tím méně se projevují destruktivní účinky a ultrazvuk vykazuje vůči buňkám spíše biostimulační efekt. Zároveň při nízké frekvenci, která má větší dosah, dojde k většímu průniku nanočástic do buněk. Při sledování viability buněk bez a s podáním smAM nanočástic se projevil vliv přítomných nanočástic smAM a to mírným poklesem viability (vždy nad 80%).

Metodou atomové absorpční spektroskopie (AAS) bylo zjištěno, že efektivita značení buněk sonoporací je nepřímo úměrně závislá na expozičním čase. Největší uptake nanočástic smAm nastal během první minuty. Po podání 500 ug Fe/ml s expozičním časem 1 min proniklo do buněk v průměru 8,46 +/- 2,8 pg Fe na jednu buňku. Dále bylo vysledováno, že s rostoucí koncentrací SPIO částic při sonoporaci roste také koncentrace Fe v buňce. Tento výsledek byl potvrzen také na MRI, kde ve vzorku s rostoucí koncentrací klesá adekvátně MR signál. V obou případech došlo k nejvyššímu uptake nanočástic v první minutě. Jedná se tedy o optimální expoziční dobu, což vyplývá také z pozorování viability. Porovnáním účinnosti značení 24 h inkubací s 1 minutou sonoporace lze říci, že se jedná o velice srovnatelné výsledky. Z časového hlediska je sonoporace výhodnější a tedy efektivnější než metoda pasivní inkubace nanočástic s buňkami.

Na závěr lze shrnout, že použitím nízkofrekvenčního ultrazvuku s přesnými klinickými parametry při značení fibroblastických potažmo kmenových buněk SPIO nanočásticemi (smAM) se dosáhne zvýšeného účinku značení při zachování životaschopnosti těchto buněk.

Seznam použitých zkratek

MSCs	mezenchymální kmenové buňky
hMSCs	lidské MSCs
rMSCs	potkaní MSCs
MRI	magnetická rezonance
SPIO	superparamagnetické nanocástice oxidu železa
VSOP	very small oxide particles
USPIO	ultrasmall superparamagnetic iron oxide
in vitro	pokusy ve zkumavkách
TEM	transmisní elektronový mikroskop
SEM	skenovací elektronový mikroskop
DLS	dynamický rozptyl světla
PCS	korelační spektroskopie
SQUID	superconducting quantum interference device (supravodivé kvantové interferenční zařízení)
MS	Mössbauerova spektroskopie
ζ	zeta- potenciál
F(t)	high-frequency, sinusoidal force
MBUS	microbubble ultrasound
PBS	fosfátovým pufrem
T_B	blokovácí teplota
NCPRP	National Council on Radiation Protection and Measurements
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MEP	magnetoelektroporace
AAS	atomová absorpční spektroskopie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
IONPs	nanočástice oxidu železa
smAM	poly(acrylic-co-maleic) acid

FBS	fetální bovinní sérum
PEN/STR	penicilin streptomycin
γ	gama
Fe	železo

Literatura

1. T.Schwann, *Microscopical researches into the accordance of structure and growth of animals and plants*. The Sydenham Society. 1847.
2. Filip, S., *Kmenové buňky - biologie, medicína, filozofie*. Vol. 1. 2006, Praha: Galén. 223.
3. Morrison, S.J., et al., *Prospective Identification, Isolation by Flow Cytometry, and In Vivo Self-Renewal of Multipotent Mammalian Neural Crest Stem Cells*. *Cell*, 1999. 96(5): p. 737-749.
4. Quesenberry, P.J., et al., *Stem cell plasticity: an overview*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2004. 32(1): p. 1-4.
5. Le Blanc, K. and O. Ringdén, *Immunobiology of Human Mesenchymal Stem Cells and Future Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005. 11(5): p. 321-334.
6. Inoue, K., et al., *The Effect of Aging on Bone Formation in Porous Hydroxyapatite: Biochemical and Histological Analysis*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1997. 12(6): p. 989-994.
7. Wilhelm, C. and F. Gazeau, *Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles*. *Biomaterials*, 2008. 29(22): p. 3161-3174.
8. Syková, E.V.A. and P. Jendelová, *Magnetic Resonance Tracking of Implanted Adult and Embryonic Stem Cells in Injured Brain and Spinal Cord*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005. 1049(1): p. 146-160.
9. Liu, Z., et al., *Advanced nanomaterials in multimodal imaging: design, functionalization, and biomedical applications*. *J. Nanomaterials*, 2010. 2010: p. 1-15.
10. Univerzita Karlova. *Ústav histologie a embriologie*. [cited 2012-01-24]; Available from:
<http://www.lfhk.cuni.cz/histologie/web/kmenove_bunky/kmenove_bunky.asp>

11. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2004. 8(3): p. 301-316.
12. Lajtha, L.G., *Stem Cell Concepts*. Differentiation, 1979. 14(1-3): p. 23-33.
13. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. Science, 1999. 284(5411): p. 143-147.
14. PurStem. 2012-01-24]; Available from:
<<http://www.purstem.eu/cmsms/index.php?page=student-zone-czech>>.
15. Matějková, E., *Mezenchymální stromální buňky – možnosti kultivace a jejich následné terapeutické využití*, ed. R. práce. 2009.
16. Bengel, F., V. Schachinger, and S. Dimmeler, *Cell-based therapies and imaging in cardiology*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2005. 32(0): p. S404-S416.
17. Dazzi, F., et al., *The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis*. Blood Reviews, 2006. 20(3): p. 161-171.
18. Reyes, M., et al., *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 2001. 98(9): p. 2615-2625.
19. Sekiya, I., D.C. Colter, and D.J. Prockop, *BMP-6 Enhances Chondrogenesis in a Subpopulation of Human Marrow Stromal Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 284(2): p. 411-418.
20. Jo, J.-i., I. Aoki, and Y. Tabata, *Design of iron oxide nanoparticles with different sizes and surface charges for simple and efficient labeling of mesenchymal stem cells*. Journal of Controlled Release, 2010. 142(3): p. 465-473.
21. Dennis, J.E., et al., *The STRO-1+ Marrow Cell Population Is Multipotential*. Cells Tissues Organs, 2002. 170(2-3): p. 73-82.
22. Deans, R.J. and A.B. Moseley, *Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses*. Experimental Hematology, 2000. 28(8): p. 875-884.
23. Cromer Berman, S.M., P. Walczak, and J.W.M. Bulte, *Tracking stem cells using magnetic nanoparticles*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2011. 3(4): p. 343-355.
24. Zipori, D., *The nature of stem cells: state rather than entity*. Nat Rev Genet, 2004. 5(11): p. 873-878.

25. Minguell, J.J. and A. Erices, *Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Cardiac Disease*. Experimental Biology and Medicine, 2006. 231(1): p. 39-49.
26. Varadan, V.K., L. Chen, and J. Xie, *Front Matter*, in *Nanomedicine*. 2008, John Wiley & Sons, Ltd. p. i-xvi.
27. Šeděnková, V., *Spinové vychýlení u nanočástic γ -Fe₂O₃ a jeho studium pomocí Mössbauerovy spektroskopie ve vnějším magnetickém poli*. 2011: Diplomová práce.
28. Reddy, A.M., et al., *In vivo Tracking of Mesenchymal Stem Cells Labeled with a Novel Chitosan-coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles using 3.0T MRI*. J Korean Med Sci, 2010. 25(2): p. 211-219.
29. Cornell, T.M., Schwertmann, U., *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Germany. p. 664.
30. Kluchová, K., *Syntéza a charakterizace nanočástic oxidů železa pro lékařské aplikace*. 2009: Disertační práce.
31. *Mineralogie*. [cited 2013].
<http://www.sci.muni.cz/mineralogie/kap_7_5_oxidy/obrazek75_77.htm>.
32. Saraswati, T.E., A. Ogino, and M. Nagatsu, *Plasma-activated immobilization of biomolecules onto graphite-encapsulated magnetic nanoparticles*. Carbon, 2012. 50(3): p. 1253-1261.
33. Jose-Yacamán, M., M. Marn-Almazo, and J.A. Ascencio, *High resolution TEM studies on palladium nanoparticles*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2001. 173(1): p. 61-74.
34. Edita Bretšnajdrová, L.S., Jirí Zelenka, *Stanovení tvaru a distribuce velikosti částice modelových typů nanomateriálů*. NANOCON 2009, 2009: p. 5.
35. *Difrakce elektronů v krystalech, zobrazení atomů*. 2012 [cited 2012].
<<http://fyztyd.fjfi.cvut.cz/2008/cd/prispevky/sbpdf/difrel.pdf>>.
36. Milan Vůjtek, R.K., Miroslav Mašláň, *Nanoskopie*. 2012, Universita Palackého v Olomouci: Olomouc.
37. Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav*. Učební text, 2006.
38. *Nano Discovery*. 2013 [cited 2013]. <<http://nanodiscoveryinc.com/technology>>.

39. Filip, J., *Úloha železa a vodíku v krystalové struktuře B- a Li- obsahujících silikátů* 2008: Disertační práce.
40. *Magnetické vlastnosti*. [cited 2013].
<http://wood.mendelu.cz/cz/sections/Props/files/verejny/FVD/Skripta_Fyzika/42.pdf>.
41. Zapletalová, J., *Mechanismus reakce nulamocného železa (Fe⁰) ve vodní fázi vedoucí k tvorbě nanočástic oxidů železa a charakterizace vzniklých produktů*. 2012: Diplomová práce.
42. Murad, E., *Properties and Behavior of Iron Oxides as Determined by Mössbauer Spectroscopy*, in *Iron in Soils and Clay Minerals*, J.W. Stucki, B.A. Goodman, and U. Schwertmann, Editors. 1987, Springer Netherlands. p. 309-350.
43. Malina, O., *Studium magnetického chování nanočástic ε-Fe₂O₃ pomocí Mössbauerovy spektroskopie ve vnějších magnetických polích*. Učební text, 2012.
44. *Měření makroskopických magnetických veličin pomocí magnetometrů*. [cited 2013]. <<http://nanosystemy.upol.cz/upload/10/cuda-mereni.pdf>>.
45. Radovan Herchel, J.T., Zdeněk Trávníček, *Střídavá susceptibilita a vysokoteplotní magnetická měření a jejich využití v chemii a fyzice*. Učební text, 2009: p. 44.
46. Stark, W.J., *Nanoparticles in Biological Systems*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. 50(6): p. 1242-1258.
47. *Polymer Nanoparticles for Gene Delivery: Synthesis and Processing (Nanotechnology)*. 2012 10.5.2012]; Available from: <<http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/polymer-nanoparticles-for-gene-delivery-synthesis-and-processing-nanotechnology/>>.
48. Bulte, J.W.M., et al., *Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells*. Nat Biotech, 2001. 19(12): p. 1141-1147.
49. Arbab, A.S., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI*. Blood, 2004. 104: p. 1217-1223.

50. Arbab, A.S., *Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability*. Mol imaging, 2004. 3: p. 24 - 32.
51. Lewin, M., et al., *Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells*. Nature Biotechnology, 2000. 18(4): p. 410-414.
52. Kraitchman, D. and J. Bulte, *Imaging of stem cells using MRI*. Basic Research in Cardiology, 2008. 103(2): p. 105-113.
53. Mo, R., et al., *Instant magnetic labeling of tumor cells by ultrasound in vitro*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2011. 323(17): p. 2287-2294.
54. Bohari, S.P., L.M. Grover, and D.W. Hukins, *Pulsed-low intensity ultrasound enhances extracellular matrix production by fibroblasts encapsulated in alginate*. Journal of Tissue Engineering, 2012. 3(1).
55. Nekula, J., *Radiologie*, ed. U.P.v. Olomouci. 2008.
56. Vachutka, J., *Ověření tepelných účinků ultrazvukového diagnostického přístroje prostřednictvím modelu tkáně*. 2007: Bakalářská práce.
57. *Ultrasonic velocity measurements of the shelf-life of topical formulations*. [cited 2013. <<http://www.skin-care-forum.basf.com/en/author-articles/the-sunscreen-sunburn-paradox/2012/12/22ee15e8-6c2d-41f2-9c30-3a86d75beb6e/ultrasonic-velocity-measurements-of-the-shelf-life-of-topical-formulations/2002/03/15?id=e5bcf506-62ea-4608-8ed0-175cc08e0475&mode=Detail>>].
58. Bernard, V., *Proliferace, viabilita a další parametry buněčných kultur po kombinované aplikaci ultrazvuku a cisplatiny*. Disertační práce, 2010.
59. *Základy přístrojových vyšetření*. [cited 2013. <http://www.propedeutika.cz/met_pristroje.html>].
60. Wells, D., *Electroporation and ultrasound enhanced non-viral gene delivery in vitro and in vivo*. Cell Biology and Toxicology, 2010. 26(1): p. 21-28.
61. Wang, Y.X., et al., *Low-intensity pulsed ultrasound increases cellular uptake of superparamagnetic iron oxide nanomaterial: results from human osteosarcoma cell line U2OS*. J Magn Reson Imaging, 2010. 31(6): p. 1508-13.

62. *Ultrasound in early diagnosis of cancer and in drug delivery*. [cited 2013].
<<http://www.ntnu.no/fysikk/medphys/ultrasound>>.
63. Jaroš, J., *Modelová studie účinků ultrazvuku na vývoj plodu*. 2009: Disertační práce.
64. *Ultrazvuk - Diagnostické a terapeutické využití*. [cited 2013].
<http://ftplf2.agarek.com/fyziopravak/biofyzika/semin/tercaza_uz.php>.
65. Mornstein, V., *Ultrazvuk v biologii a medicíně*. Učení text, 1995.
66. Baker, K.G., V.J. Robertson, and F.A. Duck, *A Review of Therapeutic Ultrasound: Biophysical Effects*. *Physical Therapy*, 2001. 81(7): p. 1351-1358.
67. Draper, D.O., et al., *A comparison of temperature rise in human calf muscles following applications of underwater and topical gel ultrasound*. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, 1993. 17(5): p. 247-251.
68. Chung, M.-F., et al., *A Liposomal System Capable of Generating CO₂ Bubbles to Induce Transient Cavitation, Lysosomal Rupturing, and Cell Necrosis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012. 51(40): p. 10089-10093.
69. Ying, Z.-m., T. Lin, and S.-g. Yan, *Low-intensity pulsed ultrasound therapy: a potential strategy to stimulate tendon-bone junction healing*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2012. 13(12): p. 955-963.
70. Miller, S.K., *Diagnostic Ultrasound Safety*. Příspěvek do článku “Exposure criteria for medical diagnostic ultrasound: II. criteria based on all known mechanisms”, 2013.
71. Dressaire, E., et al., *Interfacial polygonal nanopatterning of stable microbubbles*. *Science*, 2008. 320(5880): p. 1198-201.
72. *Ultrasound is not just for cleaning*. [cited 2013].
<http://www.pcb007.com/pages/columns.cgi?artcatid=0&clmid=&artid=57265&pg=8&_pf_=1>.
73. *Cavitation*. [cited 2013].
<http://amazingbubbleworld.blogspot.cz/2012_05_01_archive.html>.
74. Lin, J., et al., *Rapid delivery of silver nanoparticles into living cells by electroporation for surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. 25(2): p. 388-394.
75. Nickoloff, J.A., *Animal cell electroporation and electrofusion protocols*

- Vol. 48. 1995: New Jersey
76. Dousset, V., et al., *How to trace stem cells for MRI evaluation?* Journal of the Neurological Sciences, 2008. 265(1–2): p. 122-126.
77. Chemicell. *Magnetofection*. 19.5.2012]; Available from: <http://www.chemicell.com/products/magnetofection/index.html?gclid=CJDroafb_K8CFQpj3wodyEerSA>.
78. Opting. *Cyrusova, Bürkekrova komůrka a další*. 2012 15.5.2012]; Available from: <<http://www.optingservis.cz/index.php/nabidka-zboi/344-cyrusova-bkerova-komka-a-dalc>>.
79. Koplík, R., *Stanovení minerálních látek*. Učební text: p. 49.
80. Robinson, J.W., *Atomic Absorption Spectroscopy*. Analytical chemistry, 1960. 32: p. 13.
81. *Index of Experiments*. [cited 2013. <<http://intro.chem.okstate.edu/HTML/SEXP11.HTM>>.
82. Ročňová, L., *Testování rezistence B-CLL buněk s mutantní a wild-type konformací proteinu p53 na chemoterapii a jejich senzitivizace monoklonální protilátkou rituximab*. 2007: Diplomová práce.
83. *Trypan Blue*. [cited 2013. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/302643?lang=en®ion=CZ>>.
84. Škrabalová, M., *Kationické liposomy pro transfekci buněk*. 2008: Diplomová práce.
85. *Základní techniky práce s tkáňovými kulturami*. [cited 2013. <<http://che1.lf1.cuni.cz/html/TK.pdf>>.
86. *Multifocal plane analysis is essential for accurate cell viability assessment using an automated cell counter*. [cited 2013. <<http://www.biocompare.com/Application-Notes/42629-Multifocal-Plane-Analysis-Is-Essential-for-Accurate-Cell-Viability-Assessment-Using-an-Automated-Cell-Counter/>>.
87. *BTL-4710 Sono Professional*. [cited 2013. <<http://www.btlnet.com/p/physiotherapy/ultrasound-therapy/btl-4000-sono/btl-4710-sono-professional-p4710-002v100/>>.

88. BURBANO, J.L., et al., *An Application of the Prussian Blue Technique to a Light Microscope Study of Water Movement in Transpiring Leaves of Cotton (Gossypium hirsutum L.)*. Journal of Experimental Botany, 1976. 27(1): p. 134-135.