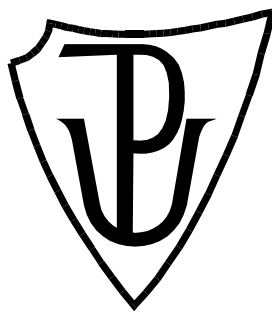


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Nanočastice pre detekciu sentinelových uzlín

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: **Katarína Hajduová**
Študijný program: B1406 Biochémia
Študijný obor: Biotechnológie a génové inžinierstvo
Forma štúdia: Prezenčná
Vedoucí práce: **Zbyněk Nový, PharmDr., Ph.D.**
Rok: 2021

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúci zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Moje poďakovanie patrí hlavne môjmu školiteľovi PharmDr. Zbyňkovi Novému, Ph.D., za jeho čas, cenné rady a postrehy, trpezlivosť a neobyčajnú ochotu a vôľu vyjsť mi v ústrety aj v neľahkých pandemických časoch, aké nastali. Taktiež ďakujem Ústavu molekulárnej a translačnej medicíny za možnosť pracovať v ich laboratóriách. Rada by som sa poďakovala aj tímu Dr. Petra Cíglera z Ústavu organickej chémie a biochémie AV ČR za poskytnutie nanočastíc. V neposlednom rade by som rada poďakovala mojim rodičom a mojej babičke, za podporu pri tvorbe tejto bakalárskej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Katarína Hajduová
Názov práce	Nanočastice pre detekciu sentinelových uzlín
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	Zbyněk Nový, PharmDr., Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Sentinelová lymfatická uzlina, ako prvá lymfatická uzlina v povodí tumoru, predstavuje dôležitý nástroj pre presné určenie štádia malígneho ochorenia a teda aj pre určenie optimálnej liečby. Jej určenie a vizualizácia je však aj v dnešnej dobe výzvou, práve kvôli jej obťažnej odlišiteľnosti od okolitého tkaniva. V predkladanej bakalárskej práci sme sa zaoberali dvoma typmi nanočastíc určených pre selektívne zobrazenie práve sentinelovej uzliny. Konkrétne zlatých nanočastíc, pre účely CT zobrazovania a následného *in vivo* farebného označenia príslušnej lymfatickej uzliny viditeľné intraoperačne voľným okom a diamantových nanočastíc, určených pre intraoperačné fluorescenčné zobrazovanie. Z každého typu skúmaných nanočastíc bol vždy jeden podtyp modifikovaný manózou, zameraný na ciele príjem prostredníctvom manózového receptora, exprimovaného na povrchu makrofágov prítomných v lymfatických uzlinách. Preukázali sme úspešnú vizualizáciu sledovaných popliteálnych lymfatických uzlín na myšom nádorovom modeli vo všetkých prípadoch a v prípade fluorescenčných nanodiamantov sme preukázali zvýšenú mieru akumulácie práve manozylovaného podtypu.

Kľúčové slová	sentinelová lymfatická uzlina, detekcia sentinelovej uzliny, CT zobrazovanie, zlaté nanočastice, fluorescenčné nanodiamanty, manózový receptor
Počet strán	82
Počet príloh	1
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Katarína Hajduová
Title	Nanoparticles in sentinel lymph node detection
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Zbyněk Nový, PharmDr., Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

The sentinel lymph node (SLN) is the first node which receives the tumor-draining lymph and potentially metastatic cancer cells. It serves as an important prognostic tool, as the presence of metastatic cells is the key factor for prognostic assessment, minimally invasive tumor staging and planning of accurate treatment. However, SLN identification and visualisation remains challenging even nowadays mainly because it is difficult to distinguish SLN from the surrounding tissue. In this bachelor thesis we examined two types of nanoparticles for selective visualisation of a SLN. More specifically, the gold nanoparticles potentially suitable for CT imaging and subsequently for *in vivo* staining which can be seen by the surgeon's naked eye and the other type, fluorescent nanodiamonds, potentially suitable for intraoperation fluorescent imaging. We examined two subtypes of each type of the nanoparticles, one superficially modified with mannose to obtain receptor mediated endocytosis by macrophages present in the lymph nodes and the second one without the mannose modification. We successfully demonstrated a visualisation and identification of desired popliteal lymph nodes in all mouse models. Regarding fluorescent nanodiamonds, we successfully proved positive effect of mannose modification on accumulation of nanoparticles in the SLN.

Key words	sentinel lymph node, sentinel lymph node detection, CT imaging, gold nanoparticles, fluorescent nanodiamonds, fluorescent imaging of sentinel lymph node, mannose receptor
Number of pages	82

Number of appendices	1
Language	Slovak

OBSAH

1 Úvod	10
2 Súčasný stav riešenej problematiky	11
2.1 Lymfatické uzliny.....	11
2.1.1 Funkcia a anatómia.....	11
2.1.2 Delenie lymfatických uzlín	12
2.1.3 Sentinelová uzlina	13
2.1.3.1 História sentinelovej uzliny.....	13
2.1.3.2 Význam sentinelovej uzliny	14
2.1.4 Malignity šíriace sa lymfogénne, s významom vizualizácie sentinelovej uzliny.....	15
2.1.5 Detekcia a zobrazenie sentinelových uzlín – princíp	19
2.1.6 Súčasne používané techniky vizualizácie SLU	21
2.1.7 Nevýhody a riziká pri zobrazovaní sentinelových uzlín súčasnými metódami.....	27
2.2 Nanočastice	29
2.2.1 Nanočastice s potenciálom pre zobrazovanie sentinelových uzlín	30
2.2.1.1 Superparamagnetické častice oxidu železitého - SPIO	32
2.2.1.2 Kvantové bodky	32
2.2.1.3 Nanodiamanty	33
2.2.1.4 Zlaté nanočastice	33
2.2.1.5 Rádionanočastice.....	34
2.2.2 Biokompatibilita nanočastíc	34
3 Experimentálna časť	36
3.1 Materiály a metódy.....	36
3.1.1 Materiály	36
3.1.1.1 Chemikálie.....	36
3.1.1.2 Prístroje	36
3.1.1.3 Nanočastice	37

3.1.1.4 Bunková línia	38
3.1.1.5 Laboratórne zvieratá.....	38
3.1.2 Metódy.....	38
3.1.2.1 Kultivácia a pasážovanie buniek	38
3.1.2.2 In vivo zobrazovanie	39
3.1.2.3 Vyhodnocovanie dát.....	40
4 Výsledky	43
4.1 Zlaté nanočastice	43
4.1.1 Nanočastice MG116	43
4.1.1.1 Stanovenie veľkosti a rádiodenzity lymfatických uzlín	43
4.1.1.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín	47
4.1.2 Nanočastice MG117	50
4.1.2.1 Stanovenie veľkosti a rádiodenzity lymfatických uzlín	50
4.1.2.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín	53
4.1.3 Porovnanie podtypov MG116 a MG117	55
4.2 Diamantové nanočastice.....	57
4.2.1 Nanočastice KK69.....	57
4.2.1.1 Stanovenie intenzity fluorescencie	57
4.2.2 Nanočastice KK70.....	58
4.2.2.1 Stanovenie intenzity fluorescencie	58
4.2.3 Porovnanie podtypov KK69 a KK70	59
4.2.3.1 Stanovenie intenzity fluorescencie	59
4.2.3.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín.....	62
5 Diskusia	65
6 Záver.....	74
7 Literatúra	75
8 Zoznam Použitých Skratiek	80
9 Prílohy	82

Ciele práce:

Ciele teoretickej časti bakalárskej práce:

- Oboznámiť sa do hĺbky s danou problematikou a vykonať literárnu rešerš obsahujúcu kľúčové slová: sentinelová lymfatická uzlina, nanočastice, zlaté nanočastice, diamantové nanočastice, CT zobrazovanie, fluorescenčné zobrazovanie

Ciele praktickej časti bakalárskej práce:

- Získanie praxe v oblasti laboratórnej práce s bunkovými líniami a ich pasážovaním, v oblasti zobrazovacích metód laboratórnych zvierat a kvantifikácií a interpretácií nadobudnutých dát
- Overenie hypotézy pre lepšiu zobrazovaciu schopnosť modifikovaných nanočastíc oproti ich nemodifikovaným ekvivalentom
- Overiť hypotézu pre zlaté nanočastice
- Overiť hypotézu pre diamantové nanočastice

1 ÚVOD

Sentinelovú uzlinu (SLU) definujeme ako prvú lymfatickú uzlinu, do ktorej je nádor drenovaný a v ktorej sa objavujú prvé metastázy. Ide o uzlinu, ktorú nádorové bunky pri svojej lymfogénnej migrácii nemôžu minúť (Neoral a Bohanes, 2012). Najčastejšie sa teda sentinelovými uzlinami zaoberáme v súvislosti s malígnymi ochoreniami, konkrétne pri malígnom melanóme, karcinóme prsníka, karcinóme penisu, či kolorektálnom karcinóme (Chen a Bilchik, 2006). Jej význam spočíva v tom, že je prvým a kľúčovým miestom pri rozširovaní zhubného nádoru, pretože zachytáva jeho bunky. Jej vyšetrením je tak možné u niektorých malígnych ochorení s pomerne veľkou presnosťou určiť rozsah ochorenia a vhodne zvoliť následnú liečbu. (Ravizzini *et al.*, 2009)

Problém však nastáva v presnom určení SLU, nakoľko to nemusí byť uzlina, ktorá je anatomicky k nádoru najbližšie alebo nemusí vykazovať žiadne patologické abnormality (Koranda, 2014). Taktiež je neoznačená uzlina v okolitom tkanive obtiažne odlišiteľná a je priam kľúčové skúsené oko operátora, ktoré je však nie vždy postačujúce. Z tohto dôvodu je viac ako žiaduce ju vhodne označiť, aby ju operátor mohol úspešne nájsť a odstrániť.

V spolupráci s Dr. Cíglerom z ÚOCHB AV ČR v Prahe testujeme dva typy nanočastíc. Konkrétne ide o zlaté nanočastice, disponujú rentgen-kontrastnými vlastnosťami, je možné uzlinu zobrazit' pomocou počítačovej tomografie (*angl. computed tomography*, CT) a taktiež sú obohatené o schopnosť vizuálneho označenia danej lymfatickej uzliny, teda operátor ju bude schopný odlišit' od okolitého tkaniva voľným okom na základe jej nadobudnutého sfarbenia. Pracujeme s dvoma podtypmi zlatých nanočastíc, konkrétne – MG116, podtyp, ktorý nie je manozylovaný a MG117, ktorý je obohatený o manózu z dôvodu hypotézy výdatnejšieho príjmu manozylovaných nanočastíc, sprostredkovanú manózovým receptorom u makrofágov.

Diamantové nanočastice disponujú fluorescenčnými vlastnosťami, teda je možné ich zobrazit' priamo na operačnej sále pomocou UV svetla a týmto spôsobom rýchlo a intraoperatívne určiť SLU. Diamantové nanočastice majú taktiež dva podtypy: KK69, ktorý nie je obohatený o manózu a KK70, ktorý je manozylovaný, a tak by mal byť lepšie prijímaný makrofágmi a vo väčšej miere sa akumulovať v SLU.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Lymfatické uzliny

2.1.1 Funkcia a anatómia

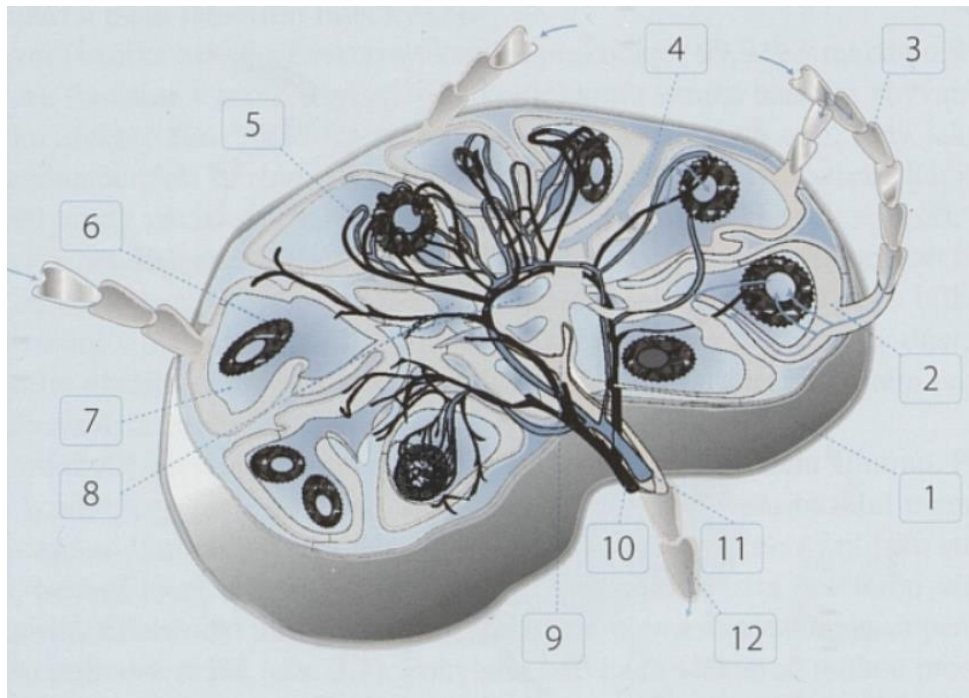
Lymfatické cievy majú v organizme tri hlavné úlohy. Prvou z nich je zachovávanie rovnováhy tekutín, lymfatický systém zachytáva tkanivový mok a navracia ho späť do krvného obehu, taktiež absorbuje látky, ktoré sa z buniek dostali do tkanivového moku a pre svoju veľkosť nemôžu byť vstrebané krvnými kapilármi. Druhou úlohou je transport mastných kyselín z tráviacej sústavy do srdcovocievneho systému. Treťou úlohou lymfatického systému je zastrešovať imunitnú obranyschopnosť organizmu. Prostredníctvom lymfatického systému prebieha transport antigénov a imunitných buniek (Čihák, 2004; Liao a Weid, 2015).

Lymfatické cievy sú prítomné takmer vo všetkých orgánoch tela. Ich začiatky – lymfatické kapiláry - sú v tkanive slepo zakončené v medzibunkovom priestore. Kapiláry vzájomne tvoria lymfatické siete, ktoré sa líšia svojim usporiadaním podľa príslušného orgánu. Môžu byť plošné alebo priestorovo rozložené, často sú dvojité.

Stena lymfatických kapilár, je podobne ako pri krvných kapilárach, tvorená jedinou vrstvou endotelových buniek. Medzi bunkami sú početné štrbiny, široké až 2 μ m (Čihák, 2004).

Endotel týchto ciev, naväzuje priamo na okolité tkanivo. Veľké a početné štrbiny v endoteli buniek umožňujú prienik makromolekúl, napr. proteínov alebo častíc (Urbánek, 2000) ale aj živých nádorových buniek, preto sa časť zhubných nádorov šíri lymfatickým systémom. (Čihák, 2004).

Zo siete lymfatických kapilár vystupujú lymfatické cievy, kolektory, ktoré následne ústia do lymfatických uzlín (obr. 1). Kolektory sú charakteristické chlopňami, tie zabraňujú spätnému toku lymfy a zabezpečujú jej jednosmerné prúdenie. Lymfatické uzliny (obr. 1) sú orgány vajcovitého až ľadvinového tvaru, s veľkosťou od 1 do 30 mm (Čihák, 2004) . Dospelý človek má v priemere 650 - 800 lymfatických uzlín, obvykle umiestnených na krku, v podpazuší, hrudníku, bruchu a slabinách (Bujoreanu, Gupta, 2020). Ich umiestnenie v organizme býva typické, avšak do istej miery variabilné.



Obr. 1 Rez lymfatickou uzlinou (schéma); 1 – púzdro, 2 - subkapsulárny sínus, 3 – aferentná lymfatická cieva s chlopňami, 4 – trabekuly, 5 – postkapilárne venuly, 6 – kôrové folikuly, 7 – kôrová oblasť, 8 – dreňová oblasť, 9 – dreňový sínus, 10 – aréria, 11 – vena, 12 – eferentná lymfatická cieva; prevzaté z: (Šimša, 2010).

Do lymfatických uzlín vstupuje po vonkajšom obvode niekoľko lymfatických ciev súčasne, nazývame ich ako aferentné, ďalej však lymfu vedie spravidla len jedna či dve – eferentné cievy. (Čihák, 2004; Bujoreanu Gupta, 2020). Takéto zoskupenie lymfatických ciev a uzlín, ktoré odvádzajú lymfu z určitej oblasti tela, sa nazýva lymfatický kmeň. Dva hlavné lymfatické kmene sú: ductus thoracicus, ktorý zbiera až 75% lymfy z tela a ductus lymphaticus dexter. Tie následne vedú lymfu späť do krvného obehu (Čihák, 2004; Shields, 2011; Johnson *et al.*, 2016; Bujoreanu Gupta, 2020).

Lymfatická uzlina je zložená z obalu, tiež zvanom kapsula. Z obalu vystupujú trávce väziva, ktoré ju oddeľujú na neuzavreté podjednotky – lymfatické uzlíky, tiež zvané ako subkapsulárne sínusy, sústredené hlavne na periférii uzliny. Lymfatické uzlíky tvoria kortex, obsahujúci prevažne B lymfocyty, bližšie k centru uzliny prechádza v parakortex, obsahujúci prevažne T lymfocyty a samotné centrum uzliny tvorí jej dreň, opäť obsahujúca prevažne B lymfocyty. Oblasť vstupu krvných ciev a výstupu eferentnej cievy sa označuje ako hilus (Čihák, 2004; Elmore, 2016).

2.1.2 Delenie lymfatických uzlín

Uzliny, ktoré vedú lymfu z určitej oblasti sa nazývajú ako regionálne uzliny a túto oblasť označujeme ako tributárnu. (Čihák, 2004). Potreba poznať konkrétne regionálne uzliny

vyplýva z vlastnosti nádorov metastázovať prostredníctvom lymfatického systému. Prvým znakom lymfogénneho rozširovania nádoru je napadnutie regionálnych lymfatických uzlín. Prítomnosť a rozsah metastázovania do lymfatických uzlín je súčasťou TNM klasifikácie, a taktiež má významný vplyv na prognózu väčšiny typov rakoviny. Určenie štádia nádorového bujnenia je hlavným kritériom pre rozhodnutie o potrebe ďalšej chemoterapie (Ravizzini *et al.*, 2009; Kholová *et al.*, 2010).

TNM systém klasifikácie a „stagingu“ slúži pre popis anatomického rozsahu malígneho ochorenia, vyvinutý Pierreom Denoirom. Po prvý raz bol publikovaný v roku 1958 ako prvé odporúčenie pre klasifikáciu klinických štádií zhubných nádorov prsníka a hrtanu Úniou proti rakovine (pozn. *angl. Union Against Cancer – UICC*).

T značí rozsah primárneho tumoru, N značí neprítomnosť, či prítomnosť a rozsah metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách a M je pre neprítomnosť, či prítomnosť vzdialených metastáz. Priradením číslice k týmto trom zložkám, konkrétne pre T je to 0 – 4, pre N 0 – 3 a pre M 0 -1 je udaný popis rozsahu ochorenia (Sobin, 2011). TNM klasifikácia býva pravidelne aktualizovaná, naposledy sa tak stalo v roku 2017.

Lymfatické uzliny sa delia na základe svojich tributárnych oblastí na:

- Lymfatické uzliny hlavy a krku
- Lymfatické uzliny hornej končatiny
- Lymfatické uzliny hrudníka
- Lymfatické uzliny panvy a brucha
- Lymfatické uzliny dolnej končatiny

2.1.3 Sentinelová uzlina

2.1.3.1 História sentinelovej uzliny

Význam lymfatického systému ako jednej z možných ciest šírenia zhubných nádorov bol študovaný po stáročia. Prvý opis lymfatického systému sa datuje v 17. storočí, kedy Gasparo Aselli popísal lymfatické cievy mezenteria u psa a považoval ich za mliekovody (Kholová *et al.*, 2010). Významným medzníkom sa však v 19. storočí stala teória Rudolfa Virchova. Ten, zrejme ako prvý, popísal lymfatické uzliny ako miesta drenáže pritekajúcej lymfy, ktoré umožňujú zachytávanie častíc od určitej veľkosti. (Neoral a Bohanes, 2012)

Termín sentinelová uzlina však ako prvý použil Ernest A. Goud v roku 1960 pri štúdiu nádoru slinnej žľazy a vyjadril dôležitosť jej histologického preskúmania a následného

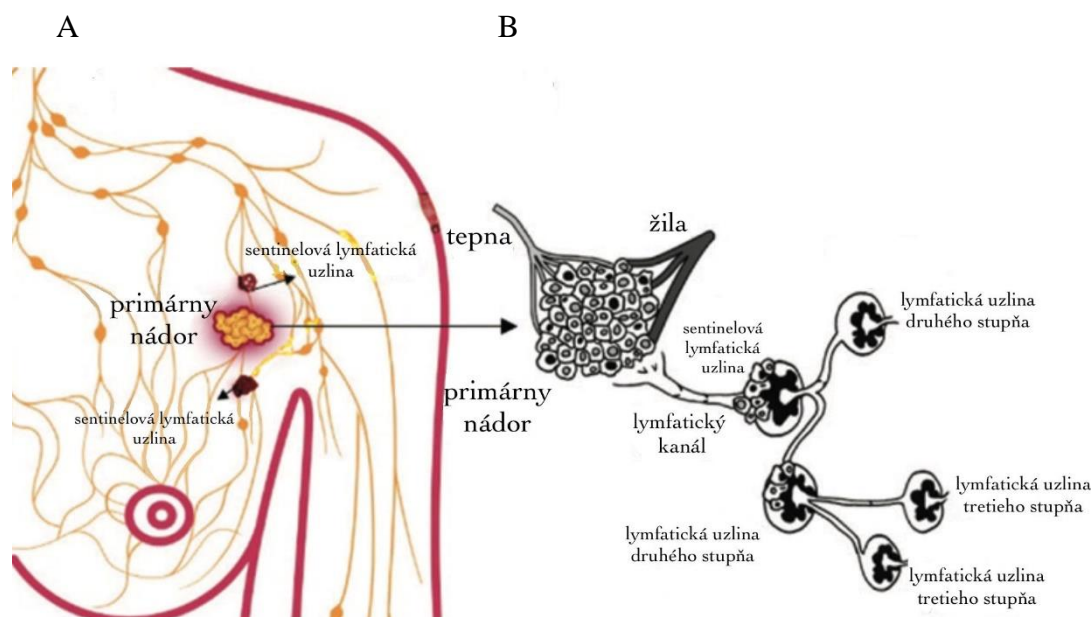
určenia ďalšieho liečebného postupu (Gould, 1960). Pôvod slova sentinel siaha až do obdobia rímskeho impéria, kedy sa ako „roman sentinel“ označovala predsunutá hliadka alebo stráž, z tohto dôvodu sa sentinelová uzlina označuje ako strážna uzlina (Šimša, 2010).

Mapovanie sentinelových uzlín ako prvý inicioval Cabanas v roku 1977 v súvislosti zlepšenia operačného prístupu pacientov s karcinómom penisu, za použitia lymfangiografie. Cabanas taktiež zaviedol pojem echeleónová lymfatická uzlina, ktorá je ďalšia v poradí odtokania lymfy, hneď po sentinelovej. (Cabanas, 1977).

1.1.3.2 Význam sentinelovej uzliny

Koncept sentinelovej uzliny vychádza z hypotézy, že existuje lymfatická uzlina v danom lymfatickom povodí tumoru, ktorá je ako prvá vystavená metastázujúcim bunkám a je možné ju identifikovať. Táto uzlina je pritom špecifická pre daný tumor a pre daného jedinca. Sentinelovú uzlinu (SLU) teda definujeme ako prvú lymfatickú uzlinu, do ktorej je nádor drenovaný, a v ktorej sa objavujú prvé metastázy. Ide o uzlinu, ktorú nádorové bunky pri svojej lymfogénnej migrácii nemôžu minúť (Cabanas, 1977; Neoral a Bohanes, 2012).

Zo zistení vyplýva, že lymfogénne šírenie metastáz je stupňovito - progresívne. Pokiaľ bunky metastázujúcej populácie preniknú do sentinelovej uzliny, zachytia sa v jej subkapsulárnych lymfatických sínusoch a až po istej dobe dochádza k prieniku nádorových buniek do vyšších etáž lymfatických uzlín – echeleónových uzlín. Doba počas ktorej je sentinelová uzlina dostatočnou bariérou pre metastatické bunky je individuálna, avšak niektoré experimenty stanovili túto dobu na cca 4 týždne od počiatku diseminácie. Sentinelová uzlina taktiež nie je zákonite vždy anatomicky najbližšou uzlinou k tumoru, a taktiež bolo preukázané, že môže byť viac ako jedna. To nastáva v prípade, že lymfa z tumoru odteká viacerými lymfatickými dráhami, prípadne v situácii, kedy sa lymfatická cieva vetví. (Neoral a Bohanes, 2012; Koranda, 2014).



Obr. 2 Schématické znázornenie koncepcie SLU A: SLU v blízkosti primárneho nádoru prsníka; B: znázornenie stupňovitosti SLU a ďalších lymfatických uzlín. Upravené podľa: (Joseph *et al.*, 2017)

Princíp teda spočíva v tom, že v prípade pozitívneho vyšetrenia sentinelovej uzliny, môžu byť postihnuté aj ďalšie, kdežto v prípade negativity, a teda nezasiahnutí metastatickými bunkami s najväčšou pravdepodobnosťou ďalšie uzliny postihnuté nie sú (Neoral a Bohanes, 2012). V štúdií pacientov s malígnym melanómom, sa preukázalo nasledovné: negatívna SLU počas biopsie bola asociovaná s 90% pravdepodobnosťou prežitia ako aj absencie mikrometastáz v echeleónových a ďalších lymfatických uzlinách, kdežto pri pozitivite SLU bola pravdepodobnosť prežitia pacienta znížená na 20 až 70% v závislosti na postihnutí zvyšku lymfatických uzlín. (Morton, 1992a; Luciani *et al.*, 2006).

2.1.4 Malignity šíriace sa lymfogénne, s významom vizualizácie sentinelovej uzliny

Už pri prvotnej diagnóze má až tretina pacientov s karcinómom prsníka, hrubého čreva, konečníka a orofaciálnej oblasti, metastaticky postihnuté lymfatické uzliny v blízkosti primárnych tumorov (Weinberg, 2014). Správnym určením SLU a následnou aplikáciou adekvátnej liečby sa však môže významne prispieť k predĺženiu ich života.

Určenie SLU je obzvlášť podstatné pri liečení nasledujúcich typov malignít:

1. Nádory kože

Len malá časť nemelanómových kožných nádorov je schopná zakladať uzlinové alebo orgánové metastázy a to hlavne v pokročilých štádiách, kedy napádajú regionálne uzliny. Poznať stav regionálnych uzlín je dôležité obzvlášť pri dlaždicobunkových karcinómoch a karcinómoch z Merkelových buniek. (Neoral a Bohanes, 2012)

Melanóm sa vzhľadom k svojmu výrazne odlišnému biologickému chovaniu oddeľuje od ostatných kožných malignít. Plne vyvinutý malígny melanóm je známy svojim vysokým metastatickým potenciálom, šíriaci sa z miesta vzniku jednak lymfogénne, ako aj hematogénne. Detekcia sentinelovej uzliny je pri malígnom melanóme celosvetovo rozšírenou vyšetrovacou metódou a jej prínos pri „stagingu“ je nespochybniteľný (Morton *et al.*, 2006). Väčší počet SLU a taktiež viac ako jedna regionálna lymfatická oblasť bola preukázaná pri viac ako 25% pacientoch, obzvlášť pri lokalizácii nádoru na trupe, krku alebo hlave (Šimša, 2010).

2. Nádory štítnej žľazy

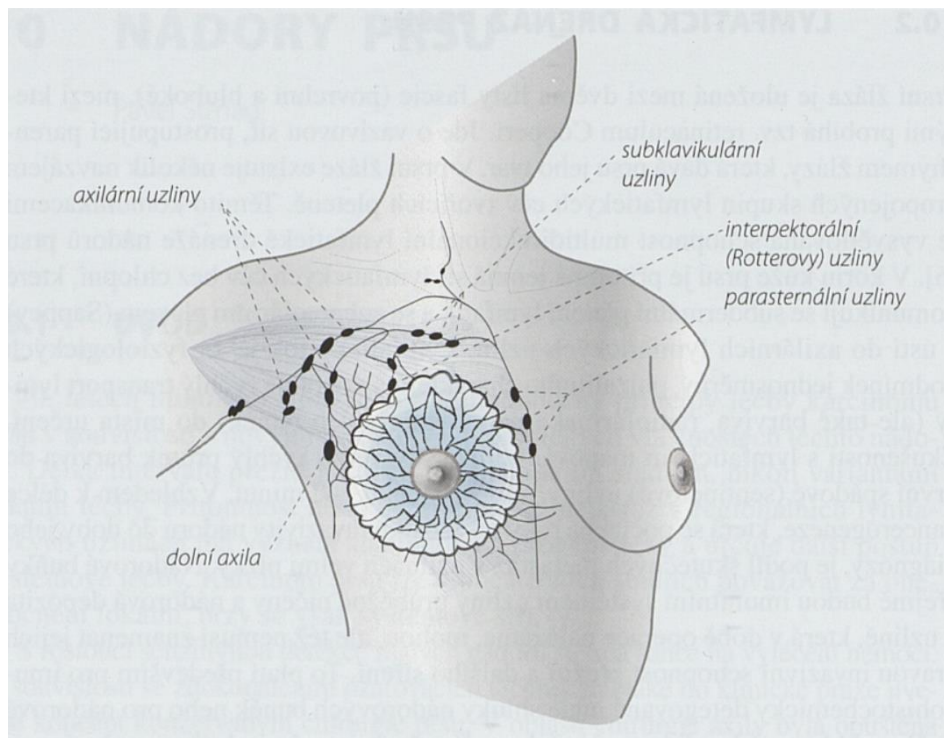
Na krku je lokalizovaných približne 150 – 200 lymfatických uzlín, ktoré predstavujú približne 1/3 všetkých lymfatických uzlín tela. Povrchové - podkožné LN majú význam predovšetkým pri šírení kožných malignít. Hlboké krčné uzliny majú prevahu v počte i význame. (Šimša, 2010). Klinická využiteľnosť techniky SLU ostáva pri nádoroch štítnej žľazy stále diskutovanou témou, pretože mnoho štúdií ju hodnotia ako spoľahlivú, avšak nevhodnú pre štandardnú klinickú prax (Neoral a Bohanes, 2012).

3. Nádory prsníka

Nádory prsníka sú v dnešnej dobe celosvetovo najrozšírenejšie onkologické ochorenia u žien. Invazívne typy rakoviny prsníka majú vysokú tendenciu rozširovať sa pomocou lymfatického systému a identifikácia SLU ako nástroja na určenie rozsahu a prognózy ochorenia má pri nich veľmi veľký význam (Šimša, 2010; Kubikova *et al.*, 2019).

Nádor prsníka býva drenovaný multidirekcionálne – štúdie sledujúce distribúciu lymfy v prsníku uvádzajú, že 15 - 20% lymfy je vedených do parasternálnych uzlín, avšak väčšina lymfy, t.j. 75 - 90% je odvádzaných do axiliárnych uzlín a zbytok do ďalších regionálnych uzlín. Z praktického hľadiska boli axiliárne uzliny Bergom rozdelené na uzliny I., II. a III. etáže (obr. 2) (Šimša,

2010; Neoral a Bohanes, 2012). Najčastejšie sú zasiahnuté metastázami axiliárne uzliny. Bol dokázaný priamo úmerný vzťah medzi veľkosťou primárneho nádoru a jeho schopnosťou metastázovať do lymfatických uzlín, pri zväčšujúcej sa veľkosti primárneho tumoru sa zvyšuje i počet zasiahnutých uzlín (Neoral a Bohanes, 2012).



Obr. 3 Lymfodrenáž prsníka s popisom anatomických kategórií príslušných regionálnych uzlín. Zdroj: (Šimša, 2010)

4. Nádory pľúc

Rakovina pľúc je, nielen na území Českej republiky, jednou z najzastúpenejších malignít. Nanešťastie takmer u 80% pacientov je ochorenie diagnostikované v štádiu, kedy už prekročilo svoj lokálny rámec a chirurgická terapia nemôže zaručiť dlhodobý terapeutický efekt. Pri skorých štádiách nemalobunkového pľúcneho karcinómu má však určenie SLU a jej následné dôkladné histopatologické vyšetrenie význam (Neoral a Bohanes, 2012).

5. Nádory zažívacieho traktu

Na rozdiel od relatívne jednoduchšej lymfodrenáže ektopických orgánov, ako je koža alebo prsník, je lymfatická sieť gastrointestinálneho traktu omnoho zložitejšia s veľkým počtom spojok lymfatických ciev. Pre karcinóm žalúdka je

typický výskyt malých uzlinových metastáz a mikrometastáz, a taktiež tu bol zaznamenaný výskyt takzvaných

„skip“ metastáz, kedy, ako názov prezrádza, metastáza preskočí centrálnu lymfatickú uzlinu – SLU a usídli sa v laterálnej lymfatickej uzline (Neoral a Bohanes, 2012; Zhao *et al.*, 2019).

Pri nádoroch zažívacieho traktu, hlavne pažeráku, má určitý význam pozitívna SLU, a to pri takzvanom MTT teste, čo je testovanie kancerózných buniek na chemorezistenciu. Odber kancerózných buniek priamo z tumora sa ukázal ako nevhodný, pretože tieto bunky boli kontaminované a neobsahovali vyhovujúce množstvo tumorózneho tkaniva. Na základe MTT testu sa následne môže zvoliť vhodná chemoterapia (Neoral a Bohanes, 2012).

Pri kolorektálnom karcinóme predoperačná detekcia sentinelovej uzliny môže pomôcť odstrániť správnu lymfatickú drenáž tumora. Až 1/3 pacientov má metastázy mimo regionálne lymfatické uzliny a až 20 % pacientov má pri štandardnom histopatologickom vyšetrení uzlín falošne negatívny výsledok (Kala *et al.*, 2011). Na rozdiel od iných malignít, ako je rakovina prsníka a melanóm, by sa mapovanie sentinelových uzlín pri rakovine hrubého čreva nemalo používať ako náhrada adekvátnej disekcie uzlín. Štúdia Chen a Bilchik, 2006 ukazuje, že zlyhanie v resekcii adekvátneho počtu lymfatických uzlín susediacich s pozitívnou SLU je spojené s horšími dlhodobými výsledkami. Mapovanie sentinelových uzlín však môže na druhej strane pomôcť identifikovať, v ktorých uzlinách je najpravdepodobnejší výskyt metastáz, a môže zlepšiť detekciu mikrometastáz umožnením sériového rezu s imunohistochemickým farbením a / alebo PCR (Chen a Bilchik., 2006).

6. Urologické nádory

Mapovanie sentinelovej uzliny má potencióálny význam pri karcinóme prostaty, avšak táto technika dnes nie je súčasťou rutinne používaných postupov a dáva sa prednosť panvovej lymfadenektómii, kedy sa chirurgicky odstráni väčšina uzlín z danej oblasti. Karcinóm prostaty nemá predikovatelnú cestu nodálneho metastatického šírenia a môžu sa prejaviť pozitívne regionálne uzliny kontralaterálne k primárnemu miestu tumora. To poskytuje priestor pre využitie konceptu značenia SLU.

Karcinóm penisu bol súčasťou vôbec prvej zmienky o koncepte sentinelovej uzliny a ako u jedinom z oblasti urologických nádorov je pri ňom všeobecne

využívaná technika značenia SLU a následná biopsia SLU (Narayanan a Wilson, 2018).

Zobrazenie SLU pri testikulárnych tumoroch poskytuje sľubný koncept štúdia lymfatického šírenia testikulárnych tumorov a v budúcnosti by mohla mať zásadný význam pre rozhodovanie o vykonaní lymfadenektómie (Šimša, 2010).

7. Gynekologické nádory

Z gynekologických zhubných nádorov sa najviac pozornosti vo výskumnej činnosti venuje nádorom vulvy a karcinómom krčka maternice. (Šimša, 2010)

Pilotnú prácu zameranú na detekciu SLU so spinocelulárnym nádorom vulvy zverejnili Barton *et al.* už v roku 1992. Avšak detekcia SLU nie je u nás stále súčasťou štandardnej zdravotnej starostlivosti. Je ale zrejmé, že potenciál využitia konceptu SLU, obzvlášť s ohľadom na zníženie postoperačnej morbidity je enormný (Neoral a Bohanes, 2012).

Pri karcinóme krčka maternice sa detekcia SLU doposiaľ nepovažuje za štandardnú techniku, avšak je prísľubom pre minimálne invazívnu liečbu skorých štádií karcinómu krčka maternice a o jej zaradení do štandardného liečebného postupu bol podaný návrh na konsenzus v roku 2008. (Neoral a Bohanes, 2012)

Identifikácia SLU je celkovo veľmi sľubný koncept a len budúcnosť ukáže, u ktorých typov malignít bude zaradená aj do štandardného operačného výkonu. V súčasnej dobe býva zaradená do výkonu pri malígnom melanóme, karcinóme prsníka a vulvy (Neoral a Bohanes, 2012).

2.1.5 Detekcia a zobrazenie sentinelových uzlín – princíp

Väčšinu lymfatických uzlín nie je možné priamo fyzicky vyšetriť. Počas uplynulých dekád boli používané hlavne neinvazívne zobrazovacie metódy ako napríklad MRI, CT či PET¹, s cieľom určiť abnormálne zväčšené uzliny, s predpokladom, že obsahujú metastatické bunky. (Luciani *et al.*, 2006). Tieto techniky však nedokážu sami o sebe určiť, ktorá uzlina je sentinelová a takéto určenie metastatických lymfatických uzlín, na základe ich patologického zväčšenia je nespoľahlivým diagnostickým kritériom. Malé uzliny, pod určenou veľkostnou hranicou môžu bezpochyby obsahovať metastázy,

¹ Pre tento účel sa použil ¹⁸F-fluór-2-deoxy-D glukóza (FDG)

pričom zväčšené uzliny môžu byť hyperplastické z dôvodu chronického zápalu (Cserni, 1999).

Technika špecifického vyhľadania SLU je založená na lymfografii v oblasti tumoru. Jej hlavným účelom je zobrazenie lymfatickej drenáže tumoru, kedy je na základe znalosti smeru drenáže možné určiť oblasť potencionálne postihnutú disemináciou tumoru, v ktorej sa nachádzajú aj eventuálne postihnuté lymfatické uzliny. Látka použitá na lymfografiu prechádza SLU a taktiež v nej dochádza k jej akumulácii. Podľa obsahu vizualizačnej látky sa následne SLU vyhľadá. (Neoral a Bohanes, 2012). Koloidné látky, ktoré sú veľkostne v škále od 2 do 200 nm prechádzajú do lymfatických ciest cez štrbiny medzi endotelovými bunkami alebo pomocou endocytózy (Schöder *et al.*, 2006).

V zásade sa na indentifikáciu SLU v praxi momentálne používajú dve metódy. Prvou je farbenie vitálnymi lymfotropnými farbivami, ktoré sa aplikujú do oblasti tumoru. Farbivo by malo byť dostatočne kontrastné od okolitého tkaniva, teda do úvahy pripadajú látky modré a zelené. Takýmto najčastejšie používaným farbivom v praxi je lymfotropná patentná modrá, ktorá sa po peritumorálnej aplikácii k primárnemu nádoru rýchlo adsorbuje do lymfatického systému a farbí lymfatickú cievu a prvú uzlinu (Šimša, 2010). Pri použití lymfotropných farbív sa približne 50% farbiva viaže na intersticiálne proteíny, prevažne na albumín a je takto vychytávaná lymfou. (Neoral a Bohanes, 2012). Patentná modrá a ani iné obdobné farbivá na rovnakej báze, nie sú aktívne vychytávané tkanivami SLU a preto postupne sfarbuju všetky lymfatické uzliny v povodí. Zobrazenie teda nie je selektívne pre SLU (Koranda, 2014).

Lymfografia SLU vitálnymi farbivami, sa datuje až do začiatku deväťdesiatych rokov, kedy Morton použil izosulfánovú modrú na vizualizáciu lymfatických ciest a SLU pri melanóme kože u ľudí. Štúdiu predchádzali pokusy zahŕňajúce ako modelové zvieratá mačky, na ktorých boli testované viaceré vitálne farbivá a techniky ich aplikácie, z ktorých sa napokon vybrala pre klinické použitie izosulfánová modrá. (Morton, 1992)

Druhou metódou určenia SLU je použitie bezfarebnej látky, ktorá je potom v oblasti SLU identifikovaná pomocou špecializovaného prístroja (Neoral a Bohanes, 2012). Ak látka, umiestnená v tele pacienta, použitá na značenie emituje rádioaktívne žiarenie, hovoríme o rádiofarmaku a takáto technika sa nazýva scintigrafická. Ak je zdrojom ionizujúceho žiarenia pri vyšetrení röntgenka, teda zdroj je umiestnený mimo tela pacienta, hovoríme o vyšetrení rádiologickom. (Koranda, 2014).

Vyšetrenie lymfatického systému za použitia postupov nukleárnej medicíny, a teda scintigraficky, je založené na možnosti zobrazit' axilárne, krčné a brušné uzliny pomocou

rádiokoloidu injikovaného do interstícia (Urbánek, 2000). Najpoužívanejším rádiofarmakom pre tieto účely je ^{99m}Tc – nanokoloid. Značené častice sú z miesta aplikácie odplavované lymfou a následne sú aktívne vychytané fagocytózou v SLU. Tento aktívny spôsob zachytávania má za následok len minimálny odtok rádiofarmaka zo SLU a preto sa jedná o selektívne zobrazenie SLU (Koranda, 2014).

Použitie tejto techniky sa datuje do roku 1993, kedy Alex a Krag opísali prvú lokalizáciu SLU za použitia ručnej gama sondy a koloidu značeného rádioizotopom technécia na zvieracom modeli malígneho melanómu (Alex, 1993). Následne techniku aplikovali u pacientov s rakovinou prsníka a dokázali určiť axiliárne SLU u 18 z 22 pacientov, pričom si v tejto štúdií kládli dve zásadné otázky a síce, či je možné úspešne identifikovať SLU a následne vykonať selektívnu resekciu a či status SLU môže predikovať stav uzlín vo vyšších etážach (Krag, 1993).

Úspešná identifikácia a histopatologické vyšetrenia prvej spádovej SLU má, ako sme už spomenuli, význam hneď z niekoľkých dôvodov. SLU je všeobecne považovaná za miesto s najvyšším rizikom uzlinového metastatického postihnutia. Preto je jej vyhľadanie a detailné histopatologické vyšetrenie umožňujúce nález uzlinových metastáz a/alebo mikrometastáz vedúce k spresneniu štádia choroby, a teda i k posunu istej časti pacientov do vyššieho štádia ochorenia kľúčové. Títo pacienti môžu potencionálne profitovať z adjuvantnej liečby. (Šimša, 2010)

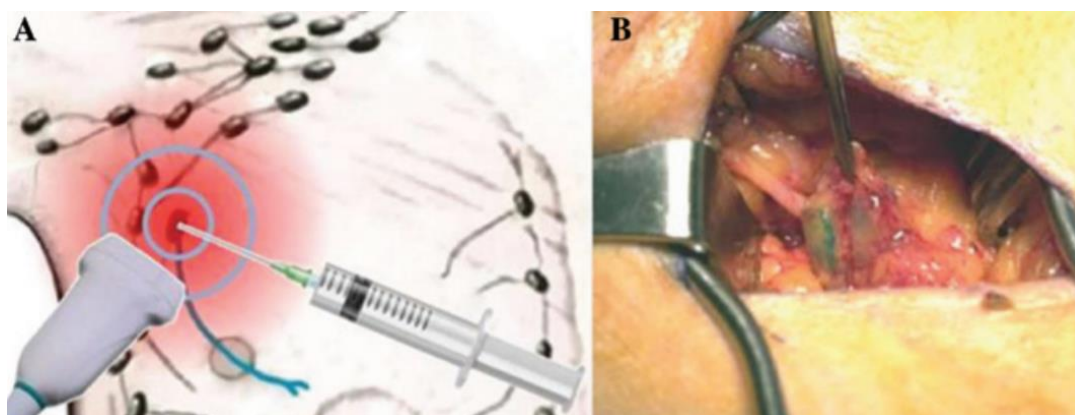
Možnosť určiť status lymfatických uzlín vo vyšších etážach je taktiež veľmi prínosná, nakoľko sa na základe predpokladu stupňovito – progresívneho vzorca šírenia môže v prípade negativity SLU upustiť od spádovej lymfadenektómie, pričom by onkologická radikalita aj „stagingová“ presnosť výkonu ostali zachované. Pacient sa teda môže vyhnúť viac extenzívnemu výkonu a mnohým komplikáciám s tým spojenými. (Šimša, 2010)

Taktiež je identifikácia SLU podľa mnohých autorov dôležitá kvôli prevencii jej prehliadnutia a ponechania *in situ* ku ktorému môže dôjsť pri parciálnej mastektómii a disekcii axily v diskontinuite u pacientov s karcinómom prsníka (Šimša, 2010).

2.1.6 Súčasne používané techniky vizualizácie SLU

Obe vyššie opísané techniky sa v praxi zvyknú používať simultánne (obr. 4), pretože je tak zaistená vyššia senzitivita a selektivita, ktorá bola opísaná už v roku 1996 Albertini *et al.*, kedy použili vitálne modré farbivo a ^{99m}Tc – sulfurokoloid (Albertini *et al.*, 1996). Dosiahnutie vyššej spoľahlivosti je však na druhú stranu vyvážené vyššou finančnou

i technickou náročnosťou procedúry, ako aj väčšou záťažou pre pacienta (Hayashi *et al.*, 2003).



Obr. 4 Vizualizácia injekčného kontrastného média na identifikáciu SLU a pigmentovanej SLU pripravenej na biopsiu. (A) aplikácia modrého farbiva a rádiofarmaka, zobrazenie SLU pomocou gama sondy. (B) Prsné tkanivo s izosulfánovým farbivom odlišujúce SLU od susedného tkaniva pre vhodnú navigáciu počas operačného výkonu. Zdroj: (Joseph *et al.*, 2017)

Technika použitia lymfotropných farbív

Spomedzi vitálnych lymfotropných farbív sa v medicínskej praxi využívajú izosulfánová modrá, patentná modrá V (PBV) a metylénová modrá (MB). Niektoré ďalšie farbivá ako indigokarmín a indocyanínová modrá sa využívajú na ďalekom východe, kde nie je komerčne dostupná izosulfánová modrá (Masannat *et al.*, 2006). Japonská multicentrická štúdia však nepreukázala žiaden signifikantný rozdiel v klinickom použití týchto farbív v porovnaní s patentnou modrou (Noguchi *et al.*, 2000).

V Európe je najčastejšie používaným lymfotropným farbivom patentná modrá (trifenylmetán), konkrétne napríklad preparát Patentblau V (PBV), vyrábaný vo Francúzsku. PBV, ako sme už vyššie uviedli, sa viaže na proteíny a je adsorbovaná do lymfatických ciest difúziou a behom niekoľkých minút farbí SLU a neskôr i ostatné lymfatické uzliny v povodí. V USA sa využíva predovšetkým izosulfánová modrá (monosodná soľ 2,5-disulfonovaného trifenylmetánu), konkrétne 1% preparát Lymphazurínu. Tieto látky sú si biochemicky veľmi podobné a nebol u nich zistený žiaden rozdiel v schopnosti vizualizovať SLU (Neoral a Bohanes, 2012).

Ide teda o techniku čisto peroperačnú, pri ktorej je dôležité kontinuálne sledovanie oblasti ihneď po aplikácii. (Šimša, 2010). Technika je navyše založená na predpoklade, že operatér pozná približnú lokalitu SLU a počas operačného výkonu postupnou disekciou tkaniva sleduje zafarbovanie lymfatickej cievy a SLU, dokým nie je možné ju priamo vizualizovať a odstrániť (Ravizzini *et al.*, 2009).

Optimálne množstvo farbiva sa pri väčšine tumorov uvádza približne 1,5 – 2 ml a aplikácia prebieha vo viacerých dávkach do blízkeho okolia nádoru. Po injekcii je 1/3 farbiva absorbovaná do 30 min, 2/3 do 1 h a 100% sa adsorbuje do 24 hodín. Behom anestézie môže farbivo imitovať cyanózu, a nakoľko lymfou prestupuje do krvného riečiska, spôsobuje modré sfarbenie pacienta, ktoré ale obvykle mizne do 48 hodín. Približne 10% farbiva odchádza v nezmenenom stave z tela močom a zvyšok stolicou a žlčou. (Neoral a Bohanes, 2012). Pri peroperačnej aplikácii farbiva treba mať na pamäti použitie čo najtenšej ihly, aby sa zabránilo kontaminácii operačného poľa, ktorá vedie k strate prehľadnosti. (Šimša, 2010)

Technika použitia rádiofarmaka

Radiačne navigovaná operácia SLU zahŕňa väčšinou tri kroky, a to aplikáciu rádiofarmaka, scintigrafiu spádovej lymfatickej oblasti a peroperačnú detekciu pomocou gama sondy (obr. 5) (Šimša, 2010).

Cieľom techniky podania rádiofarmaka je dosiahnuť jeho selektívnu akumuláciu v SLU a následne ju na základe emitovaného gama žiarenia lymfoscintigraficky zobrazit'. Zobrazenie prebieha pomocou scintilačnej kamery a gama sondy a SLU sa javí ako ložisko zvýšenej rádioaktivity v porovnaní s okolitým tkanivom (Neoral a Bohanes, 2012).

Operatér je pomocou ručnej gama sondy (obr. 5) schopný peroperačne určiť jej pozíciu na základe zvukového a číselného signálu, ktorý upozorňuje na miesta s maximálnou akumuláciou rádiofarmaka (Koranda, 2014). SLU má zvyčajne minimálne desať-násobné hodnoty v porovnaní s hodnotami nameranými mimo miesta vpichu rádiofarmaka (Alazraki *et al.*, 2002).



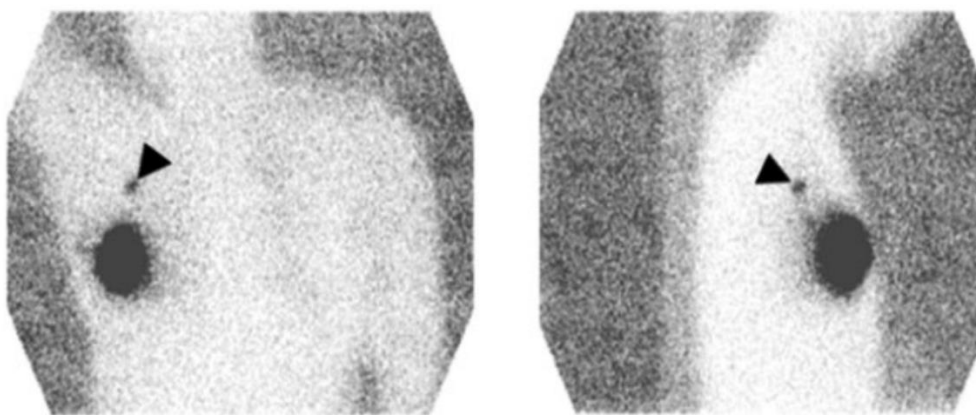
Obr. 5 Ručná gama sonda pre detekciu SLU pri scintigrafickom vyšetrení. Zdroj: (Sarikaya *et al.*, 2008).

Počas scintigrafického vyšetrenia sa zhotovuje séria scintigramov (obr. 6) v priebehu 60 – 90 minút od aplikácie rádiofarmaka. Scintigramy v ranej fáze umožňujú sledovať priebeh postupného zobrazovania LU a takto je možné presne odlíšiť SLU od prípadného zobrazovania uzlín vyššieho rádu (Koranda, 2014).

Lymfoscintigrafické vyšetrenie je zakončené zakreslením polohy SLU na pokožku v prednej a bočnej projekcii, aby bol chirurg oboznámený s orientačnou trojdimenzionálnou projekciou polohy danej SLU (Koranda, 2014)

Malé množstvo rádiofarmaka sa v závislosti na veľkosti koloidných častíc môže dostávať aj do krvného riečiska a následne byť fagocytované v slezine a pečeni. Zachytávanie rádiofarmaka v uzline je čiastočne závislé taktiež od metastatického postihnutia danej uzliny. Ak je SLU plne infiltrovaná metastázami, tok lymfy k danej uzline môže byť až úplne prerušený a takto postihnutá SLU nie je schopná rádiofarmakum vychytať. Z toho vyplýva, že ťažko metastaticky zmenené SLU nie je možné spoľahlivo detekovať a môže dôjsť až k úplnému zlyhaniu metódy (Šimša, 2010).

Používanými indikátormi sú ^{99m}Tc značené koloidné častice, V Európe je najbežnejšie používaný ^{99m}Tc ľudský sérový albumín (ang. *Human serum albumin*, HSA) vo forme nanokoloidu, s veľkosťou častíc od 4 po 100 nm (Mariani *et al.*, 2001; Ravizzini *et al.*, 2009).



Obr. 6 Anteriárne a laterálne planárne snímky hrudníka po intradermálnej aplikácii rádiofarmaka v oblasti nad primárnym tumorom. Oblasť najväčšieho signálu zobrazuje miesto vpichu indikátora a jeho príjem nádorom. SLU je viditeľná v pravej axile, označená šípkou. Zdroj: (Ravizzini *et al.*, 2009).

Experimentálne bolo dokázané, že rýchlosť vstrebávania rádiofarmaka, jeho transport a zobrazenie SLU a regionálnych uzlín je priamo závislá na viacerých faktoroch. Prvým a zároveň najdôležitejším z týchto faktorov je veľkosť častíc, ktorá by mala byť v rozmedzí 5 – 1000 nm. Častice s veľkosťou 10 – 80 nm sa do priľahlých lymfatických kapilár vstrebávajú pomerne rýchlo a behom niekoľkých málo minút značia prvé LU, avšak rýchlo postupujú i do uzlín vyššieho rádu a taktiež prestupujú do krvného riečiska. Koloidné častice s veľkosťou do 500 nm migrujú z aplikačného miesta pomalšie a v omnoho väčšej miere sú zadržané v SLU. (Šimša, 2010). Podľa niektorých autorov je ideálna veľkosť rádiokoloidných častíc pre aktívne vychytávanie makrofágmi v rozmedzí od 100 do 200 nm. Táto veľkosť predstavuje ideálny kompromis medzi efektívnym a rýchlym označením SLU (Mariani *et al.*, 2001).

Medzi ďalšie faktory patriace k určeniu kľúčových vlastností koloidných častíc patrí tiež stupeň opsonizácie, a teda pokrytie povrchu koloidnej častice molekulami, ktoré stimulujú aktívne vychytávanie makrofágmi. Následne sem patrí aj negatívny povrchový náboj koloidnej častice, jej antigénne vlastnosti a v neposlednej rade taktiež počet aplikovaných častíc (Šimša, 2010). Čo sa týka počtu aplikovaných častíc, rozhodujúca je hlavne veľkosť frakcie rádionuklidom označených častíc z celkového množstva aplikovaného rádiofarmaka. Pri ^{99m}Tc HSA je to približne 5% (Mariani *et al.*, 2001). Pri veľkom počte neoznačených častíc v rádiofarmaku, dochádza k saturácii fagocytózy v makrofágoch SLU a následne jeho prieniku do nasledujúcej LU (Šimša, 2010).

Na saturáciu fagocytózy v SLU má taktiež vplyv aj tuková degenerácia centrálnej časti uzliny, atrofia lymfatického tkaniva a aj jazvenie uzliny po predchádzajúcich zápalových procesoch (Šimša, 2010).

Najnovšie sa tiež testuje použitie kombinovaných preparátov – rádioaktívne značené lipozómy obsahujúce patentnú modrú, ale aj priamo rádioaktívne značené farbivo. (Neoral a Bohanes, 2012).

Ďalšie možné metódy zobrazenia sentinelových lymfatických uzlín

Priama lymfangiografia

Pri prvých pokusoch zobraziť lymfatický systém boli ako kontrastné látky použité olejové farbivá na báze jódu, ktoré boli najprv aplikované intradermálne s cieľom označiť hlbšie lymfatické cievy. Po ich lokalizácii sa vykonal rez, aby sa táto lymfatická cieva mohla kanylovať a aby do lymfatického systému mohlo byť zavedené jódom farbivo po dobu 60 – 90 minút. Následne bola vykonaná séria röntgenových snímok, prípadne bol vyhotovený CT sken, pre vizualizáciu anatómie lymfatického systému.

Nakoľko je však priama lymfangiografia nákladný a mimoriadne invazívny zákrok, ktorý môže spôsobiť vážne život ohrozujúce zdravotné komplikácie ako napríklad pľúcnu embóliu, pľúcny edém a iné, bola táto metóda vylúčená z bežnej zdravotníckej praxe.

Vizualizácie SLU pomocou CT

Technika súčasnej vizualizácie SLU pomocou CT, zvaná tiež CT lymfografia, využíva ako kontrastnú látku Iopamidol, ktorý sa aplikuje submukózne v štyroch miestach do tesného okolia tumoru. Jedná sa o komerčne dostupné kontrastné činidlo na báze jódu, s molekulárnou hmotnosťou 777,09 Daltona, koncentráciou jódu 370 mg/ml, a osmolaliou 780 Osm/kg (Mokhtar *et al.*, 2016).

Technika zobrazovania SLU pomocou CT má výhody hneď z niekoľkých dôvodov. Poskytuje trojdimenzionálny obraz o polohe SLU a chirurg tak jednoduchšie vykoná excíziu, taktiež CT skenovacie zariadenie je zväčša súčasťou vybavenia takmer každého nemocničného zariadenia (Minato *et al.*, 2004).

Optické zobrazovacie metódy

Indocyanínová zeleň (ICG) je klinicky schválené činidlo, jedná sa o disulfonovanú malú molekulu, ktorá je fluorforom v blízkej infračervenej oblasti a má stredné afinitné väzobné miesto na ľudský sérový albumín (HSA). Pre zreteľnejšiu viditeľnosť vo viditeľnom spektre sa ICG riedi s indigokarmínovým farbivom, ktoré je modré a viditeľnejšie v lymfatických uzlinách ako ICG (Ogasawara *et al.*, 2008).

Na základe fluorescencie SLU, ktorá sa po excitácii svetlom s vhodnou vlnovou dĺžkou v IR oblasti objavuje od 25 do 250 sekúnd od aplikácie, je možné intraoperatívne zobrazit' SLU (Ogasawara *et al.*, 2008).

2.1.7 Nevýhody a riziká pri zobrazovaní sentinelových uzlín súčasnými metódami

Súčasnú vyššie uvedené zobrazovacie metódy avšak majú isté nevýhody, kvôli ktorým vzniká potreba vynájsť a priniesť na trh dokonalejšie kontrastné látky pre zobrazenie SLU.

Medzi nevýhody peritumorálne aplikovaného modrého farbiva patrí hlavne difúzny charakter jeho vstrebávania. Modré sfarbenie je detekovateľné len do hĺbky niekoľkých milimetrov a operatér teda musí previesť primeranú disekciu. V prípade, že je SLU lokalizovaná bližšie pri povrchu je disekcia pomerne málo rozsiahla, čo je aj účelom metódy zobrazenia SLU. Avšak, ak je SLU lokalizovaná v horných axilárnych uzlinách, disekcia naberá rozsiahlejších rozmerov a operatér je nútený v nej pokračovať aj za cenu rozsiahlejšieho operačného výkonu alebo riskovať, že SLU nebude určená. V prípade zlyhania metódy určenia SLU sa pristupuje k extenzívnej disekcii axilárnych uzlín, čo predstavuje ďalšie zdravotné riziko pre pacienta a nižšiu rýchlosť následnej rekonvalescencie. (Sakorafas a Peros, 2007).

Modré farbivo taktiež vo viacerých prípadoch spôsobilo modré tetovania kože, v mieste vpichu, ktoré pretrvávalo až niekoľko mesiacov po zákroku. Konkrétne sa touto konsekvenciou zaoberali Govaert *et al.*, ktorí sledovali vzorku 33 pacientov po operačnom výkone a vybratí SLU za použitia patentnej modrej, každé tri mesiace, dokým sfarbenie kože úplne nevytizlo. V priemere sledovanie trvalo 18 mesiacov a Patentná modrá V bola viditeľná v mieste vpichu po troch mesiacoch u 70%, po šiestich mesiacoch u 64% pacientov, po deviatich mesiacoch tomu tak bolo v 44% prípadov a po dvanástich mesiacoch bolo modré tetovanie kože viditeľné u 41% pacientov (Govaert *et al.*, 2005).

PBV je súčasťou skupiny triarylnmetánových farbív, taktiež je známa pod označením E131, kyslá modrá 3, či disulfinová modrá. Používa sa ako aditívum v potravinách, kozmetike, ako textilné farbivo a taktiež ako komponent v laxatívach. (Leung *et al.*, 2019) Nakol'ko má takéto širokospektrálne využitie, senzibilita pre alergickú reakciu môže nastať pomerne ľahko (Thill *et al.*, 2014).

Alergické reakcie na PBV opísali Kalimo *et al.*, kedy sa vyskytlo šesť prípadov klinickej alergickej reakcie z 273 pacientov (2,2%), ktorí podstúpili lymfografiu s

použitím patentnej modrej. Na detekciu pacientov, ktorí majú sklon k precitlivenosti na Patentnú modrú V, sa následne rutinne začalo používať testovanie kožným vpichovaním. Pozitívne reakcie boli pozorované u 2,7% z 566 kontrol a u 2,8% zo 435 pacientov odporúčaných na lymfografiu (Masannat *et al.*, 2006).

Anafylaktický šok po aplikácii PBV bol opísaný aj v prípade sedemnást' ročného pacienta. V jeho prípade sa vyskytol dvojfázový anafylaktický šok, ktorý bol už skôr popísaný pri niektorých alergických reakciách na PBV. Dvojfázové reakcie sú definované ako počiatočná reakcia organizmu nasledovaná asymptomatickým obdobím, po ktorom prichádza druhá, zväčša silnejšia alergická reakcia spôsobená precitlivenosťou organizmu na danú látku, spontánne vyskytujúca sa od 1 do 72 hodín po rozlíšení počiatočnej reakcie (Leung *et al.*, 2019).

V neposlednom rade sa taktiež zaznamenali prípady, kedy PBV nepriaznivo ovplyvnila intraoperačné pulzné oxymetrické záznamy počas operácie rakoviny prsníka a teda spôsobila cyanózu (Li *et al.*, 2015).

Výsledky štúdie vykonanej Massanat *et al.* ukazujú, že kontrastné látky používané pre zlatý štandard na označenie SLU, konkrétne PBV a tiež MB, spôsobujú poškodenie DNA *in vitro*, pri použití rovnakých koncentrácií farbív ako pri operačnom výkone a pri vystavení tkanív farbivám po dobu piatich minút (2009).

Vďaka rádionuklidom značenému koloidu je možné SLU detekovať, aj keď je uložená hlbšie pod pokožkou a dopomôcť správne lokalizovať danú SLU. Táto metóda má však nízke priestorové rozlíšenie, vyžaduje zručnosť a skúsenosti v používaní ručnej gama sondy a vystavuje pacienta, ale najmä chirurgický tím, ionizujúcemu žiareniu, pričom vystavenie chirurgického tímu nie je jednorázové, ale opakované.

Ako miesto vpichu, tak aj SLU emitujú gama žiarenie, ide o tzv. „presvitanie“, interferujúce s detekciou žiarenia z SLU. Toto rozptýlené žiarenie často narúša detekciu SLU, obzvlášť pri jej lokalizácii v podpazuší ale taktiež aj v prípade nádorov hlavy a krku, kedy je SLU lokalizovaná príliš blízko k primárnemu tumoru, je preto potrebné dbať na to, aby sa pri použití ručného počítadla gama žiarenia zabránilo falošnej identifikácii miesta vpichu ako SLU, čo je zručnosť, ktorú je potrebné si časom osvojiť (Ravizzini *et al.*, 2009; Sugiyama *et al.*, 2020).

Ďalším úskalím je, že výrazne metastaticky postihnutá lymfatická uzlina môže spôsobiť blokovanie toku lymfy aferentnými lymfatickými kanálmi, čo zabráni jej identifikácii počas zákroku. (Ravizzini *et al.*, 2009)

Ďalšou nevýhodou môže byť polčas rozpadu $^{99\text{-m}}\text{Tc}$, ktorý je šesť hodín, a tým sa stáva limitným časovým faktorom pre časový rámec SLU biopsie (Thill *et al.*, 2014).

Kontrastné látky pre CT zobrazovanie, ako iopamidol, môžu preukázateľne spôsobiť nefropatiu u pacientov, ktorí nevykazovali žiadne patologické zmeny vylučovacieho systému pred podstúpením zákroku. (Polena *et al.*, 2005)

No hlavným problémom použitia iopamidolu je jeho nízka molekulová hmotnosť (777,08 g/mol), ktorá vedie k rýchlemu označeniu SLU, ktoré detekujeme na základe zvýšenia hodnôt Houndsfieldových jednotiek (*angl. Hounsfield unit*, HU). Toto označenie však veľmi rýchlo mizne, rádovo do 20 minút od aplikácie. Opäť tým nastáva problém príliš úzkeho časového okna pre identifikáciu a excíziu SLU. (Ravizzini, 2009) (Sugiyama *et al.*, 2020).

V štyroch štúdiách, v ktorých bola ICG porovnávaná s modrým farbivom, bolo priemerné číslo označených uzlín ako SLU v priebehu procedúry vyššie pri ICG ako pri modrom farbive. Konkrétne pre ICG bol priemerný počet excizovaných LU od 3 do 5,4 v porovnaní s modrým farbivom, pri ktorom bol tento počet od 1 do 2,4 LU. ICG teda označuje aj uzliny vyššieho rádu, čo ústi v až nepotrebné rozsiahlu disekciu a odstránenie vyššieho počtu LU, ako je potrebné (Ahmed *et al.*, 2014).

2.2 Nanočastice

V biomedicínskom zobrazovaní nanočastice (*angl. nanoparticles*, NP) nájdu uplatnenie najmä kvôli ich schopnosti priamo či nepriamo rozlíšiť zdravé tkanivá od postihnutých, či už sa jedná o rozsah ohraničenia tumoru pri jeho operačnom odstránení, lymfatickú drenáž tumoru a SLU alebo identifikáciu miesta zápalu (Pratt *et al.*, 2016).

Materiál sa považuje za NP, ak je aspoň jeden jeho rozmer rádovo 10–100 nm. NP sa syntetizujú rôznymi metódami, ktoré predovšetkým zahŕňajú „bottom up“ metódu syntézy lipozómov, micelov, polymérov, dendrimérov, uhlíkových nano-trubiek, a anorganických NP (Pratt *et al.*, 2016).

Biodistribúcia NP závisí od vlastností, ako sú veľkosť, pomer strán, náboj, tuhosť a chemická povrchová úprava. Vlastnosti NP sú rozhodujúce pre úspešnú biodistribúciu zobrazovacieho činidla a ak sú zvolené nesprávne, môžu viesť k dodaniu mimo cieľové miesto, či toxicite. Rôzne rozsahy veľkostí majú za následok výrazne odlišný charakter biodistribúcie prameniáci vo fyziológii cicavcov, a preto je veľkosť prvým dôležitým parametrom pri návrhu NP (Grimm a Scheinberg, 2011). Častice menšie ako 5 nm sa

rýchlo vylučujú obličkami, zatiaľ čo častice menšie ako 100 nm vykazujú širokú biodistribúciu v rôznych orgánoch (Schroeder *et al.*, 2012).

Okrem veľkosti sú tvar a povrchový náboj ďalšími kľúčovými vlastnosťami, ktoré ovplyvňujú mieru internalizácie NP. Ukázalo sa, že pozitívne nabité NP tyčinkovitého tvaru vykazujú zvýšený príjem *in vitro* a taktiež vyššie špecifické a nižšie nešpecifické príjmy *in vivo* v porovnaní s identickými sférickými časticami (Gratton *et al.*, 2008; Kolhar *et al.*, 2013).

Nakoľko NP majú vysoký pomer povrchovej plochy k objemu, stávajú sa ideálnymi modelmi pre variabilitu povrchového náboja, polymérneho obalu a špecifických cieľových ligandov, táto variabilita určuje ich biodistribúciu a redukuje nešpecifický príjem bunkami. Cieľové ligandy pre povrchovú konjugáciu a adsorpciu môžu byť napríklad malé molekuly, peptidy, aptaméry či protilátky. Navyše je možné k nim pripojiť rádioaktívne látky pomocou chelátorov alebo prostetické skupiny, a tým meniť vlastnosti NP v porovnaní s neoznačenými NP (Pratt *et al.*, 2016).

2.2.1 Nanočastice s potenciálom pre zobrazovanie sentinelových uzlín

Nakoľko hlavným cieľom celého SLU konceptu je zmapovať lymfatickú drenáž tumoru pomocou exogénnych kontrastných látok, určiť adekvátne LU ako SLU a následne vykonať ich excíziu a histopatologické vyšetrenie, je dôležité aby mali dané kontrastné látky určité požadované vlastnosti (Cousins *et al.*, 2014).

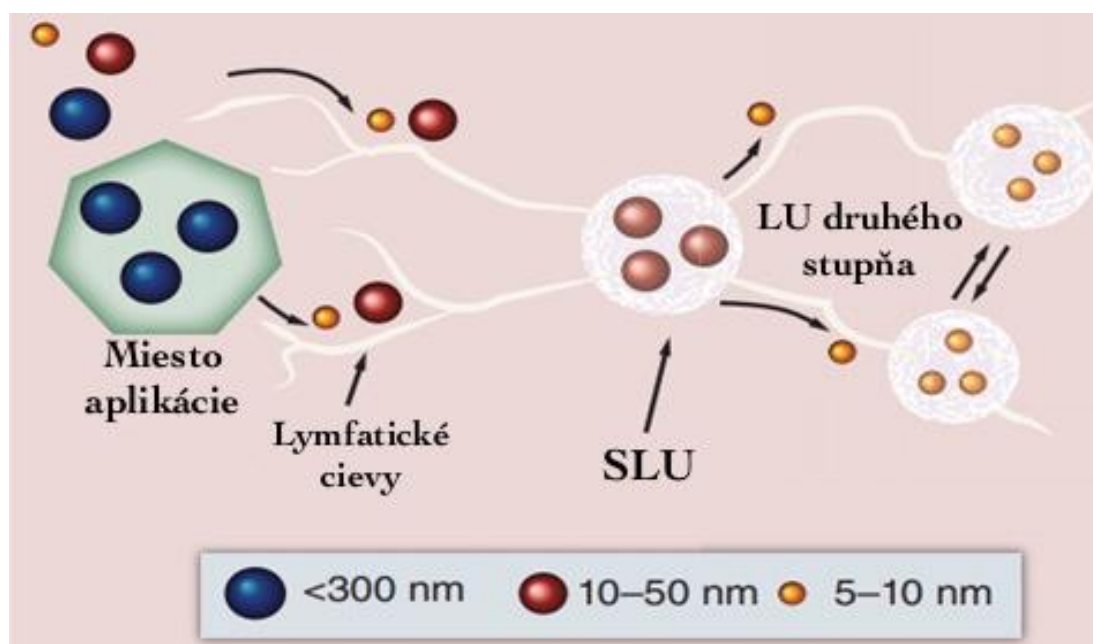
Vlastnosti, ktorými by ideálne próby s účelom vizualizovať SLU mali disponovať a ktoré by sa pri návrhu NP mali brať do úvahy sú:

1. Dostatočne dlhý retenčný čas v SLU pre zabezpečenie adekvátneho zobrazovacieho časového rámca pri operácii
2. Dostatočne vysoká intenzita emitovaného signálu
3. Biokompatibilita a netoxicita voči telu pacienta
4. Vysoké priestorové rozlíšenie
5. Dostatočne vysoká fotostabilita pre opakované prístrojové zobrazovanie, ako preoperačné tak aj intraoperačné
6. Primeraná veľkosť v rozmedzí od 10 – 50 nm (obr. 7)
7. Možnosť dodatočnej modifikácie
8. Ekonomické a jednoduché použitie (Li *et al.*, 2015)

Tieto vlastnosti sú využiteľné pre všetky klinicky používané zobrazovacie metódy ako napríklad gamma počítadlo, röntgen/CT, MRI, ultrazvuk alebo fluorescenciu a tým pádom vytvárajú priestor pre mnoho rôznych typov kontrastných látok.

Lymfotropné kontrastné látky sú širokou skupinou, ktorá zahŕňa látky od tých s nízkou molekulárnou hmotnosťou akými sú organické či anorganické molekuly a cheláty po väčšie, pevné nanočastice, často označované ako rádiokoloidy alebo nanokoloidy a ostatné nanoštruktúry schopné zvýšiť kontrast pre použitú zobrazovaciu metódu (Cousins *et al.*, 2014).

Ako sme už spomenuli v predchádzajúcich kapitolách, stále je zásadnou vlastnosťou veľkosť častíc danej kontrastnej látky (obr. 7). Tá musí byť dostatočne malá aby bola schopná preniknúť do lymfatického povodia a dostatočne veľká aby sa zachytila v subkapsulárnych sínusoch danej SLU (Cong *et al.*, 2010).



Obr. 7 Schématické znázornenie mapovania SLU pomocou nanočastíc. Nanočastice veľkosti 5 – 10 nm prechádzajú cez SLU a pokračujú do LU vyššieho rádu v danom lymfatickom povodí; nanočastice s veľkosťou častíc 10 – 50 nm vykazujú rýchly príjem SLU a dlhý retenčný čas v SLU; nanočastice s veľkosťou nad 300 nm prevažne ostávajú v mieste injeckáže a ich následné putovanie do SLU je veľmi obmedzené a tým sú irelevantné pre klinické použitie s účelom vizualizácie SLU. Upravené podľa: (Li *et al.*, 2015)

2.2.1.1 Superparamagnetické častice oxidu železitého - SPIO

Vývoj superparamagnetických nanočastíc oxidu železitého (*angl. superparamagnetic iron oxide, SPIO*) ako kontrastných látok pre MRI len zväčšuje implementáciu využiť MRI v zobrazovaní SLU (Li *et al.*, 2015).

Prvé SPIO dextranované nanočastice (ferumoxtran-10) pre lymfangiografiu boli zamerané hlavne na určenie metastatického postihnutia SLU. Využíval sa aktívny príjem pomocou fagocytózy, a teda vysoko metastaticky postihnuté SLU neakumulovali také množstvo SPIO, ako tie metastaticky negatívne (Wang, 2011).

Hirawa *et al.* sa zamerali na termoresponzívne magnetické nanočastice (Therma-Max), ktoré boli zacielené na SLU pomocou špecifickej teploty agregácie. Reverzibilná agregácia sa dosiahla pomocou N-izopropyl akrylamidu, ktorý je schopný prejsť z kvapalného na agregovaný pri zahriatí na teplotu tela (2012).

SPIO NP pokryté karboxydextránom (60 nm v hydrodynamickom priemere) sa momentálne začali používať v klinickej praxi pod názvom Sienna + ® (Endomagnet ics, Ltd, UK) (Staník *et al.*, 2018). Tieto NP boli úspešne použité aj v multicentrickej štúdií SentiMAG so 160 pacientmi na identifikáciu SLU pomocou ručného magnetometra. Výsledky ukazujú, že toto SPIO agens poskytuje rovnako úspešnú a v niektorých prípadoch úspešnejšiu mieru detekcie SLU ako pomocou tradičného ^{99m}Tc rádiokoloidu (Thill *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Kvantové bodky

Kvantové bodky, (*angl. Quantum dots, QDs*), sú širokou skupinou polovodičových nanomateriálov s možnosťou emitovať široké rozpätie fluorescenčného spektra. Majú viac vrstiev, ich jadro je tvorené prvkami skupín II-VI alebo III-V periodickej sústavy a obal ďalšími polovodičivými prvkami, tým sú schopné emitovať svetlo v NIR (*ang. Near infrared, NIR*) oblasti. (Peng a Li, 2010).

Trojvrstvové QDs navrhnuté Kim *et al.* obsahujúce InAs_xP_{1-x} v jadre, InP v strednom obale a ZnSe v plášti mali upraviteľnú emisiu NIR (> 800 nm) a zvýšený kvantový výťažok, umožňujúce vizualizáciu SLU na modeli potkana. (Kim *et al.*, 2005).

Taktiež boli predstavené samo-osvetľujúce bio-QDs, CdTe/CdS-QDs pokryté bioluminiscenčným proteínom, luciferázou z *Renilla reniformis*. V prítomnosti koelenterazínu boli tieto bio-QDs schopné emitovať bioluminiscenciu na zobrazovanie SLU v myšom modeli bez použitia ďalších optických zdrojov (Chu a Wu, 2012).

2.2.1.3 Nanodiamanty

Fluorescenčné nanodiamanty (*angl. Fluorescent nanodiamonds, FND*) sú po chemickej stránke inertné, neobsahujú toxické prvky a nepodliehajú degradácii v biologických systémoch. (Schrand *et al.*, 2007). FND majú potenciál pre využitie v bio-zobrazovacích metódach, nakoľko pokroky v zobrazovacom výskume ukazujú, že FND sú vhodné na dlhodobé sledovanie rôznych typov buniek, akými sú aj rakovinové bunky. Následne sa získané znalosti o rakovinových bunkách dajú ďalej použiť na sledovanie štádia ochorenia (Claveau *et al.*, 2018).

FND majú významné výhody oproti iným NIR nanosondám, vďaka neobmedzenej fotostabilite, inherentnej biokompatibilite a hemokompatibilite, nevykazujú toxicitu pre pečeň, nespôsobujú systémový zápal a nie sú teratogénne (Ni *et al.*, 2018).

Momentálne sa pre zobrazovanie *in vivo* používajú FND s veľkosťou častíc 100 nm. Vaijayanthimala *et al.* aplikovali FND s nekovalentne viazaným BSA s cieľom vizualizácie SLU v myšom modeli. Vizualizácia prebehla úspešne a SLU boli správne identifikované (2012).

2.2.1.4 Zlaté nanočastice

V porovnaní s mnohými inými kovovými nanočasticami majú nanočastice vyrobené zo vzácnych kovov ako zlaté zlaté nanočastice (AuNP), odlišné elektronické a optické vlastnosti. Pri excitácii AuNP svetlom špecifických vlnových dĺžok, dopadajúce fotóny silne interagujú s vodivým pásmom elektrónov a spôsobujú ich osciláciu s rezonančnou frekvenciou. Táto kolektívna oscilácia je známa ako lokalizovaná povrchová plazmónová rezonancia (*angl. localized surface plasmon resonance, LSPR*), ktorá vytvára silné a lokalizované elektromagnetické polia a umožňuje citlivú detekciu zmien v dielektrickom prostredí obklopujúcom povrch nanočastíc.

Táto vlastnosť umožňuje ich významné využitie pri zobrazovaní, dodávaní liečiv a pri terapeutických aplikáciách pri malígnom ochorení. AuNP sa používajú ako zobrazovacie činidlá a biosenzory vďaka svojej schopnosti emitovať fotóny po ožiarení.

Zlaté nanočastice (*angl. gold nanoshells, AuNShs*) sa skladajú z jadra oxidu kremičitého pokrytého tenkým kovovým plášťom zo zlata. Zmenou pomeru polomeru jadra k hrúbke plášťa sa vlnová dĺžka povrchovej plazmónovej rezonancie dokáže prispôbiť od viditeľnej po NIR (Sudhakar a Santhosh, 2017).

AuNP tiež účinne rozptyľujú röntgenové lúče a poskytujú tak kontrast pri röntgenovom snímaní. AuNP môžu byť taktiež rádioaktívne označené aktiváciou

neutrónov a môžu byť týmto spôsobom detekované prostredníctvom gama žiarenia. (Sperling *et al.*, 2008)

Song *et al.* použili AuNP ako kontrastnú látku pre zobrazenie LU pomocou fotoakustického zobrazovania (*angl. photoacoustic imaging*, PAI) v štúdiu, kde použili ako modelové organizmy potkany a určili SLU so zvýšeným kontrastom a dobrým priestorovým rozlíšením. Tiež zistili, že PAI umožňuje pomocou AuNP mapovať SLU v hĺbke približne 33 mm (Song *et al.*, 2009). Cai *et al.* hodnotili transport AuNP rôznych veľkostí v lymfatickom systéme na rovnakom modeli a výsledky ich výskumu preukázali, že vďaka väčšiemu prierezu optickej absorpcie boli 50 nm AuNP účinnejšie ako kontrastné činidlo pre PAI v porovnaní s 30 nm náprotivkami. Povrchový náboj AuNP môže navyše ovplyvniť ich rýchlosť migrácie cez SLU rádovo neutrálne > záporné > kladné (Cai *et al.*, 2011).

Luke *et al.* vyvinuli ďalšiu kontrastnú látku pre PAI – Si-AuNPs (*ang. Silica coated gold nanoparticles*, nanočastice s povrchovou vrstvou kremíku) a preukázali jej využiteľnosť pri mapovaní SLU s PAI (Luke *et al.*, 2013).

2.2.1.5 Rádionanočastice

Nanočastice oxidu železitého (*angl. iron oxide nanoparticles*, IONP) pokryté polyetylén glykolom boli rádioaktívne označené ^{68}Ga a použité na zobrazovanie SLU, pomocou PET / MR / CLI (Madru *et al.*, 2014).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ bol tiež použitý pre konjugáciu s IONP, striebornými NP (AgNP) či AuNP. Medzi ďalšie látky s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ patrí $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sírný nanokoloid, konkrétne filtrovaný <100nm $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sírný nanokoloid, používaný v USA pre SLU mapovanie pri rakovine prostaty. Pre dlhšie zobrazovacie štúdie sa používajú ^{111}In a ^{67}Ga spolu s rôznymi druhmi jódových kontrastných látok (Pratt *et al.*, 2016).

2.2.2 Biokompatibilita nanočastíc

Existujú určité kategórie nanočastíc, o ktorých sa často uvádza, že majú cytotoxické účinky. Napríklad nanočastice na báze uhlíka vykazovali toxicitu vo viacerých testoch *in vitro* a *in vivo*. Ukázalo sa najmä, že uhlíkové nanorúrky indukujú mezotelióm, čím napodobňujú toxicitu azbestu, prirodzene sa vyskytujúceho karcinogénneho minerálneho vlákna (Wolfram *et al.*, 2015). Podľa toho nemusia byť škodlivé účinky uhlíkových nanorúrok dôsledkom pôvodného materiálu, ale skôr ich tvaru, čo ukazuje, že bezpečnosť nanočastíc veľmi závisí od ich morfológie (Johnston *et al.*, 2009).

Rovnako môže byť veľkosť nanočastíc určujúcim faktorom pre biokompatibilitu. Napríklad sa ukázalo, že nanočastice zlata s priemerom 1,4 nm sú toxické, zatiaľ čo rovnaké častice s priemerom 15 nm nevykazovali toxicitu (Pan *et al.*, 2007).

Okrem nanočastíc zlata vykazovali cytotoxické účinky aj ďalšie NP na báze kovov. Napríklad niekoľko štúdií odhalilo cytotoxické účinky nanočastíc striebra. Okrem toho sa tiež zistilo, že častice oxidu železa vykazujú škodlivé vlastnosti *in vitro* aj *in vivo*, hlavne v dôsledku tvorby reaktívnych foriem kyslíka (*angl. reactive oxygen species, ROS*). Škodlivé účinky pôvodných nanočastíc možno znížiť pomocou napríklad povrchovej modifikácie. Pre ilustráciu, pridanie hydroxylových skupín k časticiam gadolínium-fullerénu zabránilo tvorbe ROS, čím sa znížila toxicita a polymérny povlak na povrchu nanočastíc oxidu železa dramaticky zlepšil životaschopnosť buniek (Wolfram *et al.*, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiály a metódy

3.1.1 Materiály

3.1.1.1 Chemikálie

Pre kultiváciu buniek bolo použité tkzv. DMEM médium (Dulbecco's Modified Eagle's medium, (Lonza, Švajčiarsko)) s prídavkom 10 % tepelne inaktivovaného fetálneho bovinného séra (FCSi, (Merck, USA)) obsahujúceho 1 % neesenciálnych aminokyselín (Merck, USA), 1 % pyruvátu sodného (Merck, USA) a 1% antibiotík (100U/100µg na ml penicilín/streptomycín (Gibco® Thermo Scientific, USA)).

Pre enzymatické uvoľnenie buniek z dna kultivačnej nádoby bol použitý TrypLE (trypsín, Merck, USA), pre opláchnutie buniek bolo použité PBS, taktiež značky Merck, USA.

Ako nosič pre bunky typu B16-F10 v priebehu implantácie bola použitá zmes kultivačného média (DMEM+10 % FBS, Merck, USA).

Ako inhalačné anestetikum bol použitý isoflurán vo podobe prípravku Forane (Abbott, USA) a pre inhaláciu bol použitý medicínálny kyslík Respirox (SIAD, ČR). Aby sa zabránilo vysychaniu očí zvierat počas anestézie, boli ošetrené očnou masťou Ophthamo-Azulén (Zentiva, ČR).

Ďalej boli používané v laboratóriu bežne dostupné chemikálie v analytickej čistote dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Merck, USA.

3.1.1.2 Prístroje

Kultivácia a pasážovanie buniek: inkubátor (Thermo Scientific, USA), laminárny box Herasafe KS (Thermo Scientific, USA), vodný kúpeľ (Memmert, Nemecko), mikroskop Primo Vert (Zeiss, Nemecko) a centrifúga Rotina 420R (Hettich, Nemecko).

Zobrazovanie laboratórnych zvierat: hybridný systém PET/SPECT/CT Albira (Bruker Corp., USA) (obr. 9) , systém pre inhalačnú anestéziu pre laboratórne zvieratá (Summit Anesthesia Support, USA) a systém MS FX PRO (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA) pre fluorescenčné zobrazovanie.

Spracovanie dát: Albira Suite, Albira Aquirer, PMOD, Bruker MI SE software a Molecular Imaging Software (ver 7.1.20220), (všetko od firmy Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA).

3.1.1.3 Nanočastice

Všetky typy nanočastíc boli dodané a vyrobené tímom Dr. Petra Ciglera z Ústavu organickej chémie a biochémie AV ČR.

Zlaté nanočastice

Použité boli koloidné nanočastice, so silikovým (z oxidu kremičitého) 108 nm veľkým jadrom. Po pozlátení je ich celková veľkosť cca 165 nm. Ich povrch je modifikovaný vrstvou polyméru, alkínom obohateného HPMA (*N*-(2-hydroxypropyl) metylakrylamid). Tento polymér je veľmi hydrofilný, netoxický a neimunogénny. (Lammers a Ulbrich, 2010). Ich absorpčné spektrum je 615 nm.

Nemanozylované – MG116 (MG=Miroslava Guricová)

Nemanozylované zlaté nanočastice boli v experimentoch použité ako prvý podtyp nanočastíc. Ich povrch nie je špeciálne upravený pre stimuláciu receptorom indukovaného príjmu LU.

Manozylované – MG117

Zlaté nanočastice s označením MG 117 boli povrchovo modifikované pomocou D-manózy. Makrofágy prítomné v LU disponujú manózovým receptorom (MR, CD 206), a teda je možné dosiahnuť cieľnú akumuláciu NP v LU. *Diamantové nanočastice*

Vysoko koloidne stabilné ~ 200 nm HPHT FND (*angl. high pressure high temperature fluorescent nanodiamonds*, fluorescenčné nanodiamanty vyrobené pod vysokým tlakom a za vysokej teploty), ktoré poskytujú ultra jasné dvojfarebné emisie v blízkej infračervenej oblasti a vo viditeľných spektrálnych oblastiach. Po excitácii zeleným (532 nm) a oranžovým (590 nm) svetlom FND emitujú v oblasti 560 - 800 nm. Excitácia modrým svetlom (488 nm) vedie k zelenej (500 - 550 nm) emisii, ktorú je možné paralelne využiť na nezávislú spektrálnu detekciu FND. KK69 (*KK=Kludia Kvaková*) disponujú povrchovou koloidnou stabilizáciou pomocou alkínom modifikovaného polyglycerolu.

Nemanozylované – KK69 (KK=Kludia Kvaková)

Nemanozylované KK69 boli v experimentoch použité ako prvý podtyp FND. Nanočastice nedisponujú žiadou špeciálnou povrchovou úpravou určenou k stimulácii receptorom indukovaného príjmu LU.

Manozylované – KK70

Podtyp č. 2 sú ultrajasný 200 nm fluorescenčné KK70, ktorých povrch je obohatený o D-manózu. Toto obohatenie manózou je z rovnakého dôvodu ako pri zlatých NP, a síce,

že makrofágy prítomné v LU disponujú manóзовým receptorom (MR, CD 206), a teda je možné dosiahnuť cieľnú akumuláciu NP v LU.

3.1.1.4 Bunková línia

Ako model pre malígne ochorenie bola použitá línia melanómu B16-F10 (ATCC, Manassas, VA, USA), ktorá má pôvod vo vybranom rode myši C57BL/6. Jedná sa teda o cicavčí model melanómu a nádory majú vysoko reprodukovateľný exponenciálny rastový vzor. Bunky boli do použitia uchovávané vFBS + 10% DMSO (dimetylsulfoxid, Merck, USA) pri teplote – 180 °C.

3.1.1.5 Laboratórne zvieratá

Pre *in vivo* rakovinový model boli použité myši rodu C57BL/6, konkrétne osem týždňové samice (Envigo, Horst, Holandsko). Tento model bol vybraný z dôvodu vhodnosti pre skúmanie lymfatických metastáz v uzlinách a stopercentnej kompatibility s vybranou tumorovou bunkovou líniou (Servais, 2011).

Ako *in vivo* kontrolný, zdravý, model boli použité osem týždňové a samice myši rodu BALB/c (Bagg and Albino, (Envigo, Horst, Holandsko)).

Všetky použité myši mali váhu približne 20 – 25 gramov, boli chované vo zverinci s režimom chovu SPF (*angl. specific pathogen free*, bez špecifických druhov patogénov, SPF) s dostatkom vody a krmiva. Chov aj experimenty boli vykonané v súlade so všetkými právnymi normami pre prácu s laboratórnymi zvieratami (Zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvierat proti týraniu, v znení neskorších predpisov) a so súhlasom Ministerstva poľnohospodárstva (Odbor živočíšnych komodít) a Krajskej veterinárnej správy Štátnej veterinárnej správy pre Olomoucký kraj.

3.1.2 Metódy

3.1.2.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunky boli kultivované v kultivačných nádobách s médiom v inkubáre pri teplote 37 °C a 5 % CO₂. V inkubátore bola udržiavaná vlhkosť a keď konfluencia buniek dosiahla hodnotu nad 75%, bolo vykonané ich pasážovanie v laminárnom boxe. Pred pasážovaním boli PBS a tryple umiestnené do vodného kúpeľa (37 °C) aby sa dosiahla ich optimálnu teplotu pre bunky. Taktiež bolo spustené UV svetlo pre dezinfekciu v laminárnom boxe na dobu 30 minút. Následne bolo z kultivačných nádob odsaté pôvodné médium a bunky boli kývavým pohybom nádoby opláchnuté PBS. Po odsatí PBS bol pridaný tryple

a nádoba bola umiestnená na tri minúty do inkubátora, aby sa bunky oddelili od steny kultivačnej nádoby. Po ich uvoľnení bolo pridané čerstvé kultivačné médium a opakovaným nasávaním a vypúšťaním buniek o dno nádoby boli zhluky buniek od seba oddelené. Pasážovanie sa vykonávalo v pomere 1:2.

Implantácia buniek ($0,5 \times 10^6$ buniek/myš) do laboratórnych myší bola vykonaná subkutánne do pravého zadného chodidla. Do jedenástich dní od implantácie boli pozorované nádory zasahujúce už viac ako 50% chodidla.

3.1.2.2 *In vivo* zobrazovanie

Jedenásť dní po implantácii B16-F10 buniek, boli myšiam intratumorálne do pravého zadného chodidla aplikované nanočastice v objeme 20 μ l (~ 10 mg/ml). V prípade zdravých myší aplikácia nanočastíc prebehla subkutánne do pravého zadného chodidla.

Po 24h v prípade aplikovaných KK69 a KK70 nasledovalo fluorescenčné zobrazenie celého tela, ktoré prebehlo v anestéze za použitia 2% izofluránu. Následná eutanázia zvierat bola vykonaná prostredníctvom izofluránu a prerušenia miechy v oblasti krčných stavcov. Ďalej sa odobrali popliteálne LU a opäť sa nasníмали pomocou systému pre fluorescenčné zobrazovanie In-Vivo MS FX PRO umiestnené v mikrotitračnej doštičke s nízkou mierou autofluorescencie (PerkinElmer, Waltham, MA). Na získanie všetkých snímok bolo použité identické nastavenie osvetlenia (doba snímania = 60 s, filtre = 630 nm pre excitáciu a 700 nm pre emisiu, f-stop = 2,8, zorné pole = 100 mm a binning = 2×2) a fluorescenčná emisia sa normalizovala na fotóny/s/mm².

V prípade aplikácii zlatých nanočastíc bolo zobrazovanie pomocou CT snímania (prúd 400 μ A, napätie 45 kV, 600 projekcií) uskutočnené vždy 24h a 48h p.i. (angl. post injection, po injektovaní) v zdravých myšiach a v prípade nádorových myší bolo snímanie vykonané len 24h p.i.. Celkový sken jednej myši trval cca 30 minút. Pred začiatkom samotného snímania bolo v programe Albira Aquirer adekvátne nastavené odsadenie lôžka pre potkany, tzv. „offset“, ktorý bol vždy 80 mm. Po ukončení snímania prebehla rekonštrukcia danej snímky v programe Albira Reconstructor.

Myši boli pred každým snímaním uvedené do anestézie najprv 4% inhalačnou dávkou izofluránu po dobu 5 minút a následne bola dávka znížená na 2% na dobu približne troch minút. Počas tejto doby prebehla aplikácia očnej masti, aby sa predišlo vysychaniu očí počas snímania. Myš bola následne umiestnená do lôžka pre potkany v CT prístroji a jej zadné nohy boli adekvátne zafixované lepiacou páskou, aby bola zaistená lepšia

viditeľnosť popliteálnych LU. Po ukončení snímania bola myš umiestnená späť do chovnej klietky.

Následná eutanázia zvierat bola vykonaná prostredníctvom izofluránu a prerušenia miechy v oblasti krčných stavcov. V prípade zdravých myší bola eutanázia vykonaná 48h p.i. a v prípade zdravých myší 24h p.i..

Všetky myši sme po eutanázii podrobili pitve.

3.1.2.3 Vyhodnocovanie dát

Dáta pre diamantové nanočastice získané pomocou príslušného obslužného softwaru MolecularImaging Software (ver 7.1.20220) (Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA), boli následne kvantifikované manuálne, kde sme označili ROI (*angl. region of interest*, oblasť záujmu, ROI), teda príslušnú lymfatickú uzlinu a systém následne vypočítal ich priemernú intenzitu fluorescencie uvedenú v P/mm²/s, teda počet emitovaných fotónov na milimeter štvorcový za sekundu.

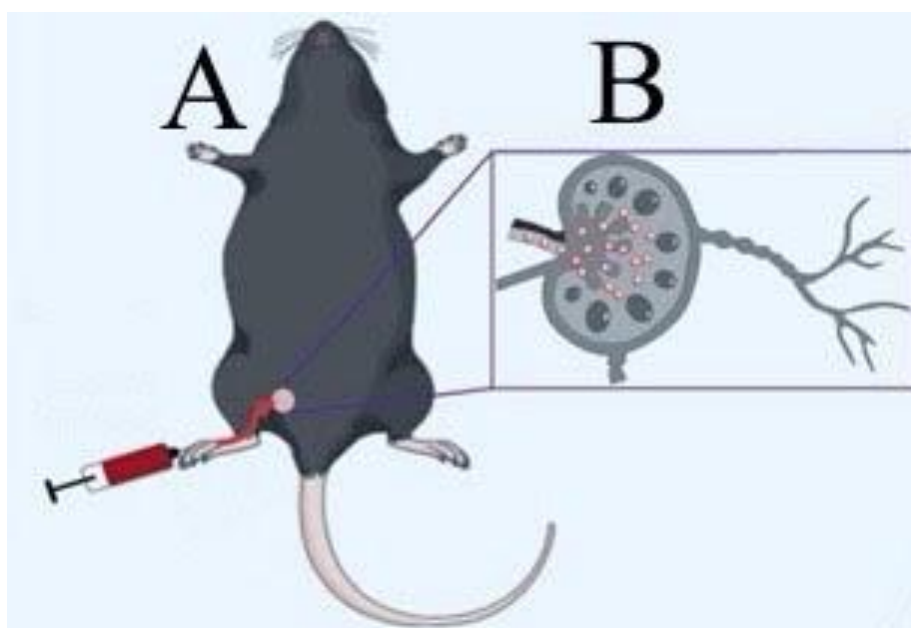
Dáta pre diamantové nanočastice sa uvádzajú ako priemer ± štandardná odchýlka (n = 5 alebo 4). Získané výsledky boli analyzované pomocou nepárového jednostranného Studentovho t-testu v programe Microsoft Office Excel 2010.

Dáta pre zlaté nanočastice boli vyhodnotené prostredníctvom programu PMOD, kde boli v jednotlivých rekonštrukciách snímok manuálne označené tkzv. VOI (*angl. volume of interest*, objem záujmu) samostatne pre pravú, teda pozitívnu LU – obsahujúcu nanočastice a ľavú, negatívnu, neobsahujúcu nanočastice. Program následne generoval nielen objem danej LU ale aj priemernú hodnotu jej rádiodenzity, s ktorou sme následne pracovali vo výsledkovej časti.

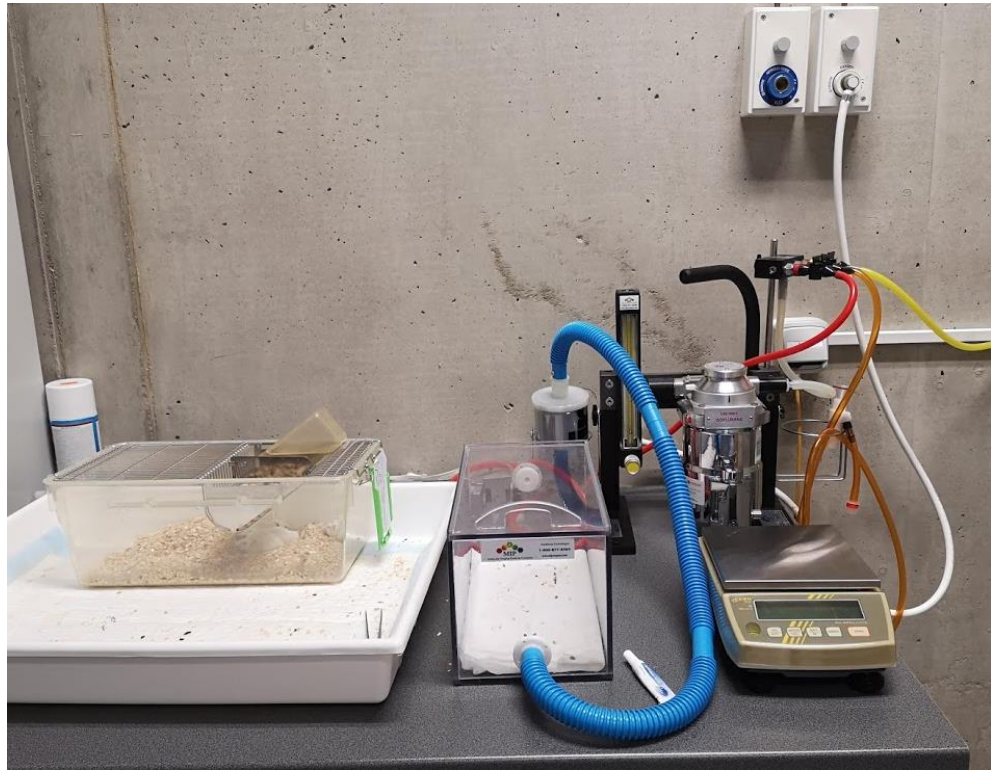
Následne boli dáta spracované pomocou programu Microsoft Office Excel 2010 a získané výsledky boli taktiež analyzované pomocou nepárového jednostranného Studentovho t-testu v programe Microsoft Office Excel 2010.



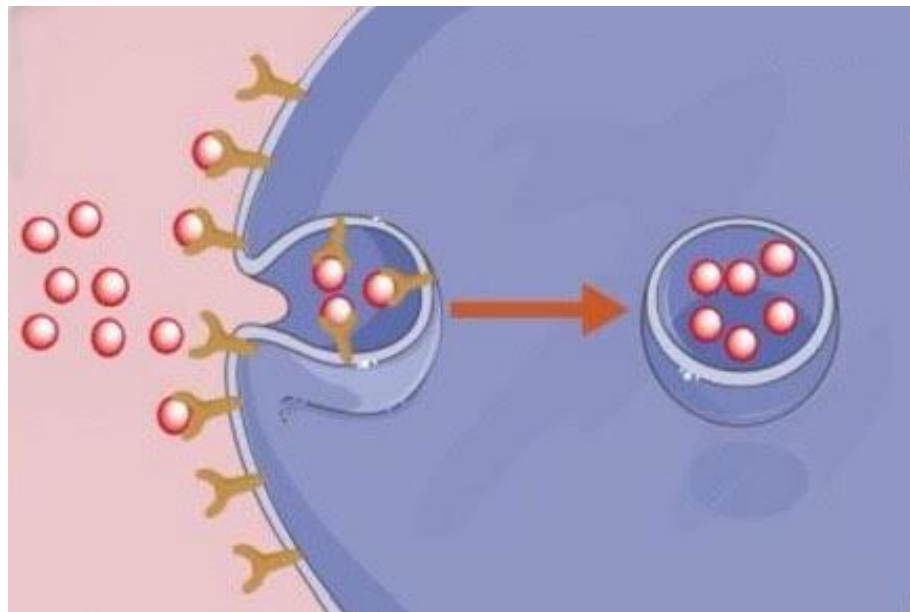
Obr. 8 Prístroj Albira pre PET/SPECT/CT zobrazovanie laboratórných zvierat. V pravej časti prístroja je umiestnené lôžko pre laboratórne zvieratá, ktoré sa počas samotného snímania presunie do ľavej časti, kde sú umiestnené konkrétne zobrazovacie zariadenia. Prístroj je napojený na systém inhalačnej anestézy. Foto: Hajduová Katarína



Obr. 9 Schéma podania nanočastíc a ich retencie v LU: A: subkutánná aplikácia nanočastíc do pravej zadnej končatiny; B: retencia podaných nanočastíc v popliteálnej lymfatickej uzline. Upravené podľa: (Uthaman, 2018)



Obr. 10 Systém pre inhalačnú anestéziu laboratórných zvierat: Vľavo: kliečka s laboratórnymi myšami, vybavená hoblinami, vodou a potravou (granule). Uprostred: uzavretý box pre úvod do anestézie s prítokom kyslíka a izofluránu (červenou) a výstupným filtrom pre nespotrebovaný izoflurán (modrou), vedľa sa nachádza očná masť. Vpravo: zariadenie pre inhalačnú anestéziu s regulátormi kyslíka a izofluránu. Foto: Hajduová Katarína



Obr. 11 Schéma receptorom indukovaného prijímu manózou modifikovaných nanočastíc makrofágmi. Upravené podľa: (Uthaman *et al.*, 2018)

4 VÝSLEDKY

Vo výsledkovej časti vždy pod pojmom pozitívna popliteálna lymfatická uzlina rozumieme uzlinu anatomicky najbližšie k miestu aplikácie nanočastíc, a teda uzlinu, v ktorej sú tieto nanočastice následne akumulované. V našom prípade ide o popliteálnu lymfatickú uzlinu na pravej strane zvierat'a, keďže aplikácia nanočastíc prebehla subkutánne do pravej zadnej končatiny (vid' Obr. 9). Ako negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu označujeme jej zrkadlový náprotivok, teda sa jedná o popliteálnu lymfatickú uzlinu na ľavej strane zvierat'a, v ktorej sa nepredpokladá žiaden výskyt aplikovaných nanočastíc, teda slúži ako negatívna kontrola.

4.1 Zlaté nanočastice

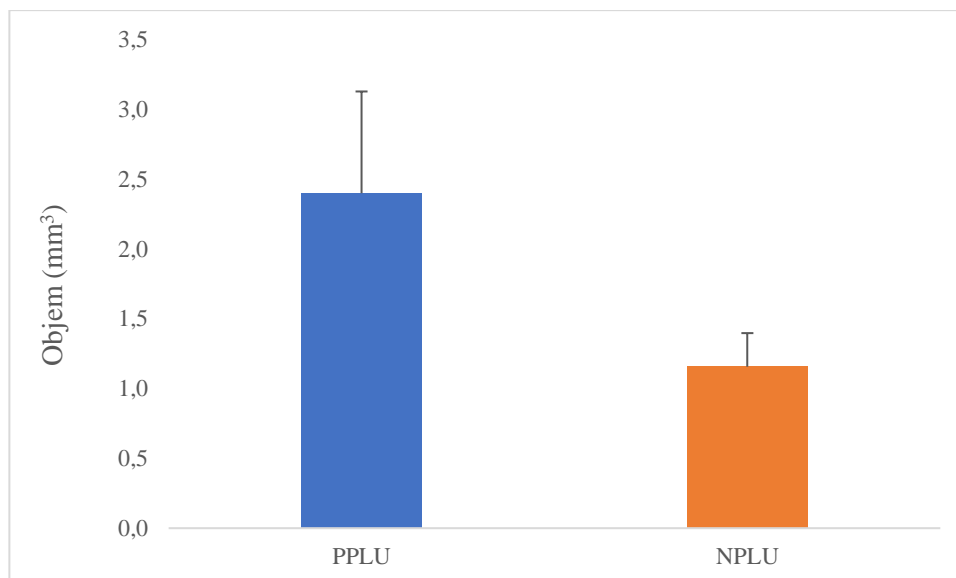
Nami skúmané zlaté nanočastice, konkrétne tzv. „nanoshells“, sú určené pre peroperačnú vizualizáciu sentinelových lymfatických uzlín pomocou techniky počítačovej tomografie – CT. Na základe CT zobrazenia získa operatér anatomicky presnú predstavu o pozícii danej lymfatickej uzliny, keďže CT patrí do kategórie prístrojov schopných zhotoviť 3-D obraz snímanej štruktúry (Urbánek, 2000).

Ďalšou špecifickou výhodou použitých zlatých nanočastíc je ich schopnosť farebne označiť danú lymfatickú uzlinu na základe ich retencie v nej, teda pri excízii lymfatickej uzliny ju operatér bude môcť rozlíšiť voľným okom.

4.1.1 Nanočastice MG116

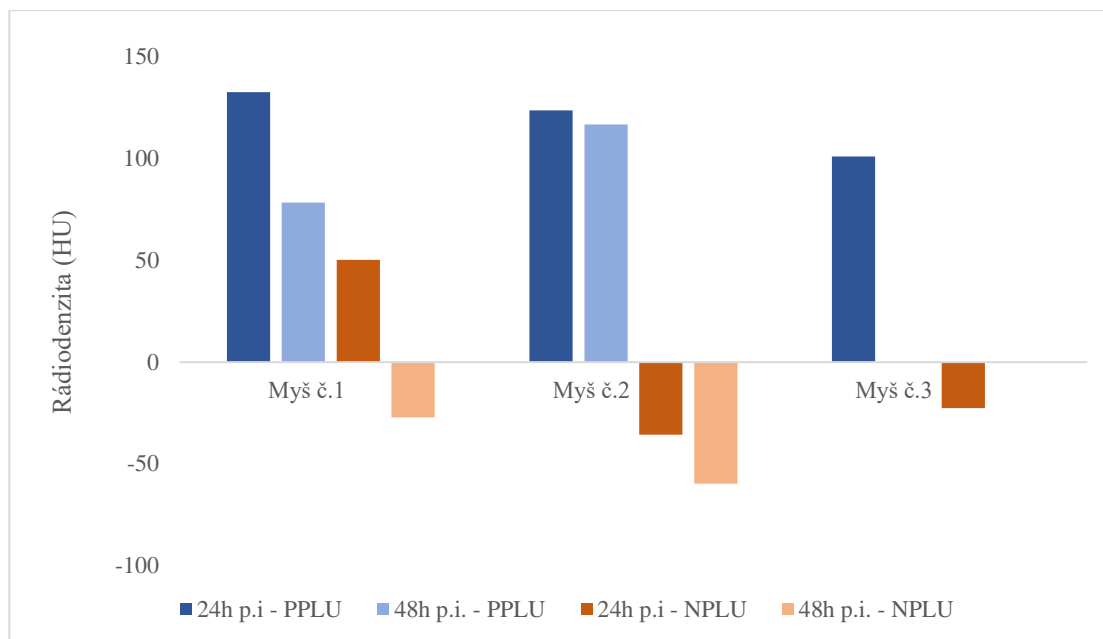
4.1.1.1 Stanovenie veľkosti a rádiodenzity lymfatických uzlín

Graf 1 znázorňujúci porovnanie priemerného objemu pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) v zdravých myšiach 24h p.i. nám ukazuje, že objem PPLU bol priemerne dvojnásobný ako objem NPLU. Priemerný objem PPLU bol $2,40 \pm 0,73 \text{ mm}^3$ a priemerný objem NPLU bol $1,16 \pm 0,24 \text{ mm}^3$.



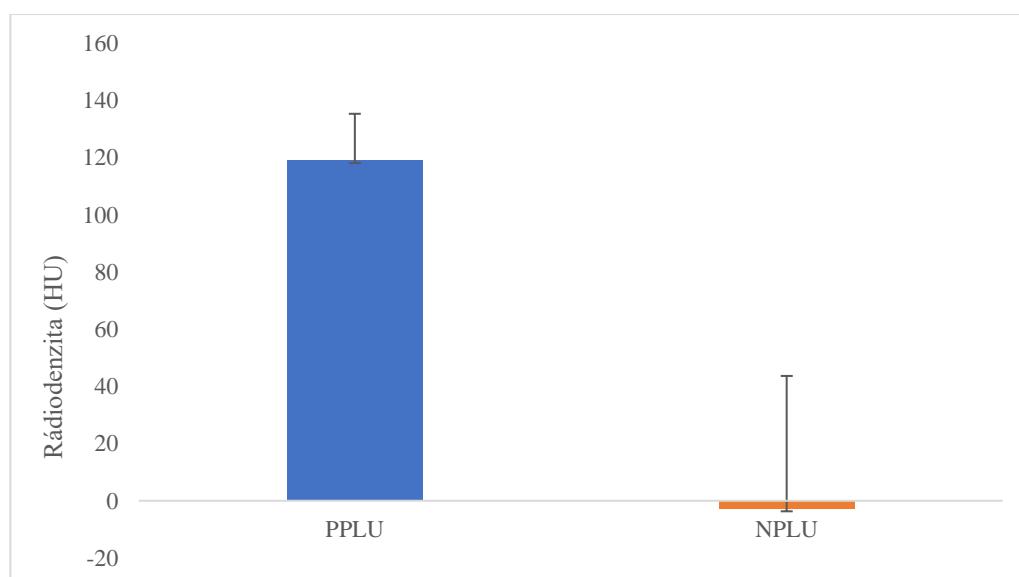
Graf 1 Priemerný objem pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) v zdravých jedincoch 24 hodín po aplikácii MG116. Uvedené údaje sú priemerné hodnoty ($n=3$) \pm ich smerodajné odchýlky.

Na grafe 2 pozorujeme hodnoty rádiodenzity uvedené v Hounsfieldových jednotkách (HU) pre PPLU a NPLU v čase 24h p.i. a 48h p.i. zlatých nanočastíc MG116 v zdravých myšiach. Myš č.3 uhynula na neznámu príčinu pred možným meraním 48h p.i., preto údaje z daného merania 48h p.i., nie sú uvedené. Keďže počet myší pre interval 48h p.i. klesol na $n=2$, čo je počet, ktorý nie je štatistickou vzorkou vhodnou na jej analýzu, tento graf nie je uvedený ako priemerné množstvá rádiodenzity \pm ich smerodajné odchýlky.



Graf 2 Porovnanie hodnoty rádiodenzity pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) pre MG116 na CT snímkach 24h a 48h p.i. v zdravých jedincoch. Myš č.3 uhynula, preto jej údaje 48h p.i. chýbajú.

Pri porovnaní rádiodenzity PPLU v čase 24h p.i., ktorej priemerná hodnota je $119,13 \pm 16,24$ HU a NPLU, ktorej priemerná hodnota je $-2,68 \pm 46,34$ HU (viď obe graf 3) vidíme, že aplikované zlaté nanočastice typu MG116 štatisticky významne ($p < 0,05$) zvýšili rádiodenzitu PPLU oproti ich negatívnym kontrolám - NPLU.

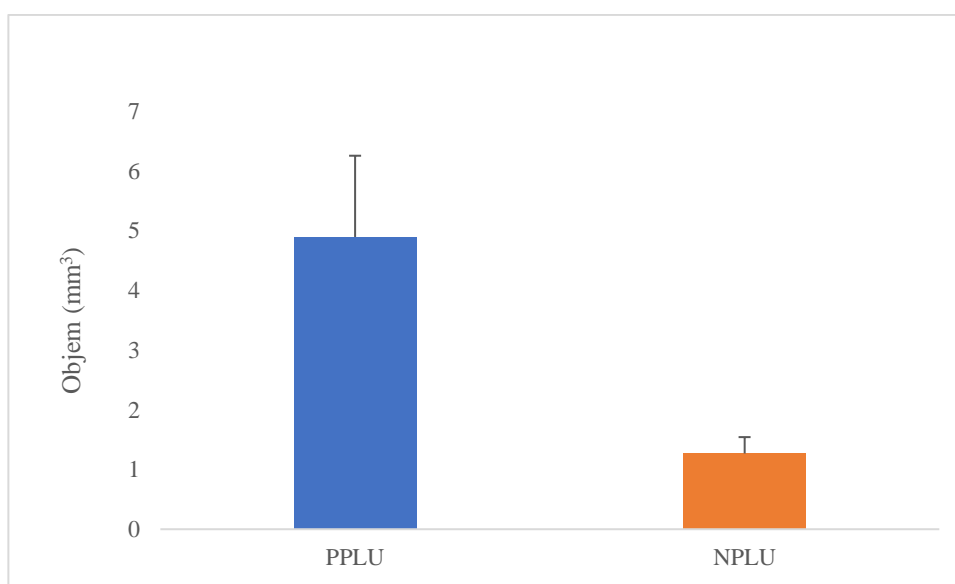


Graf 3 Priemerné hodnoty rádiodenzity pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, uvedené údaje sú zo zdravých myší (n=3) 24h po subkutánnej aplikácii MG116.

B16–F10 nádorové myši:

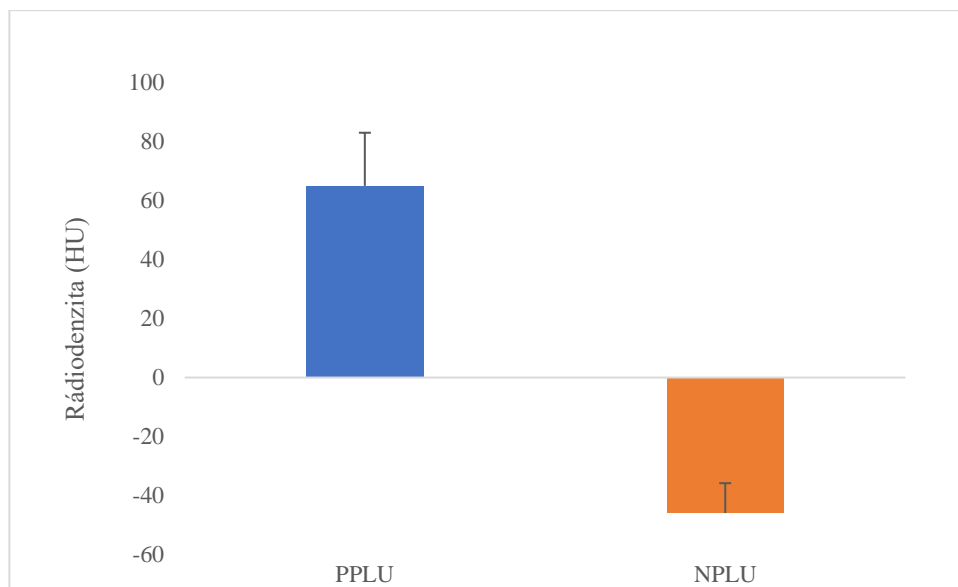
CT sken prebehol len v čase 24h p.i., nakoľko sme na zdravých kusoch overili, že je to najvhodnejší čas pre jeho vykonanie.

Na grafe 4 pozorujeme priemerné objemy pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny v myšiach s nádorom z implantovaných buniek B16-F10. Priemerný objem negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny bol $1,27 \pm 0,27 \text{ mm}^3$. Naproti tomu objem pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny bol v priemere $4,89 \pm 1,36 \text{ mm}^3$. Objem pozitívnych popliteálnych uzlín bol však v priemere viac ako trojnásobný ako objem negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín.



Graf 4 Priemerný objem pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (PPLU) a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, uvedené údaje sú z B16-F10 nádorových myši (n=5) 24h po intratumorálnej aplikácii MG116

Ako ilustruje graf 5, rádiodenzita popliteálnych lymfatických uzlín v nádorových B16-F10 myšiach sa PPLU bola v priemere $64,96 \pm 17,99 \text{ HU}$ a rádiodenzita NPLU bola v priemere $45,93 \pm 10,13 \text{ HU}$. Štatisticky vyjadrené, hodnota rádiodenzity PPLU bola štatisticky signifikantne vyššia ($p < 0,0005$) ako hodnota rádiodenzity NPLU.

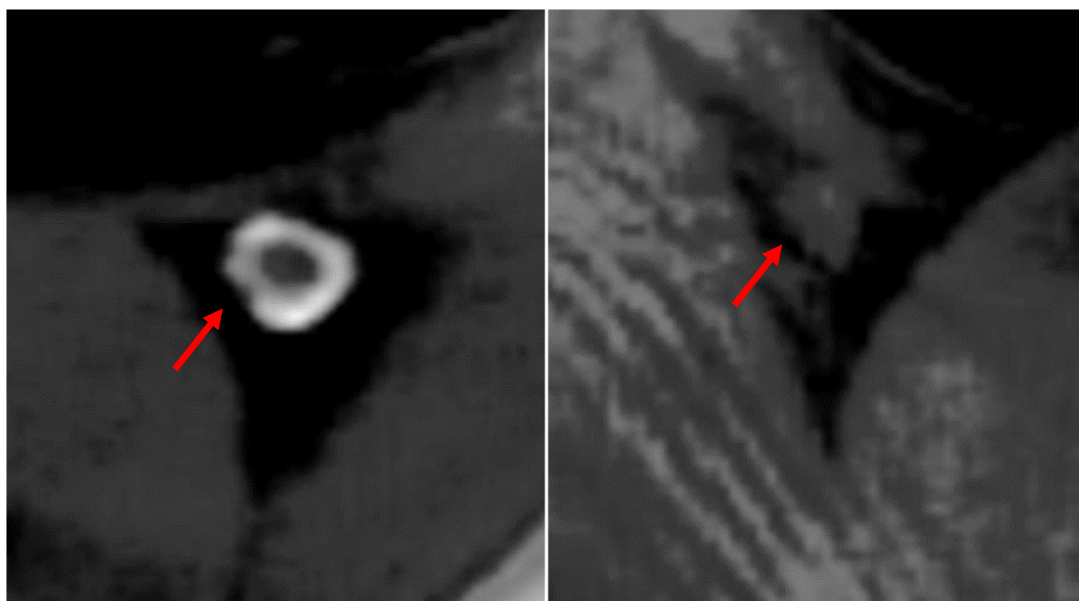


Graf 5 Priemerná rádiodenzita (HU) pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky v B16-F10 nádorových myšiach (n=5) 24h po intratumorálnej aplikácii MG116.

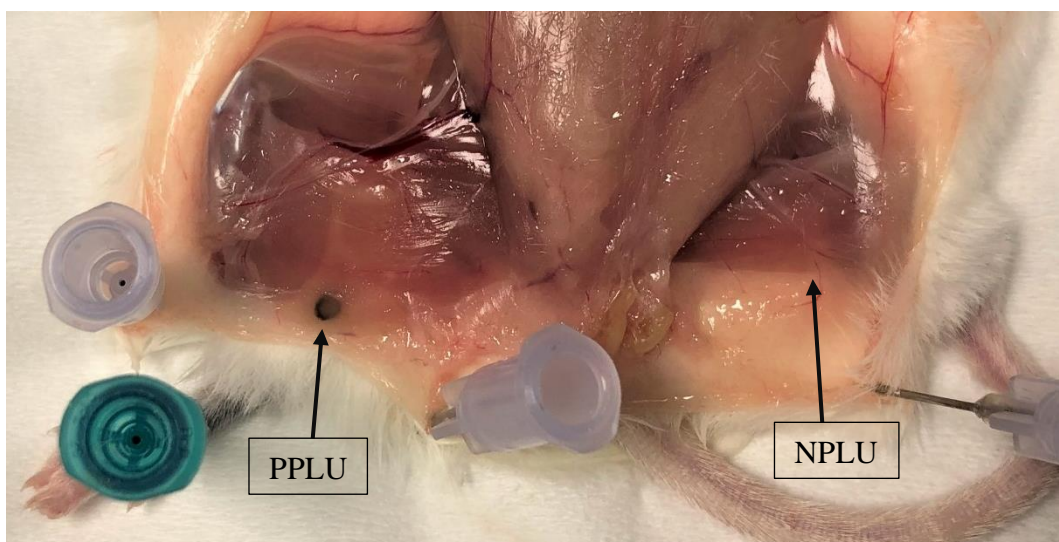
4.1.1.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín

Skutočnosť akumulácie nanočastíc typu MG116 potvrdzujú aj CT snímky (vid' obr. 12 a 14), kedy sme boli na schopní PPLU odlíšiť a úspešne určiť už na prvý pohľad, v oboch skupinách myší, t.j. aj v zdravých aj v B16-F10 nádorových, keďže nanočastice efektívne zvýšili ich rádiodenzitu.

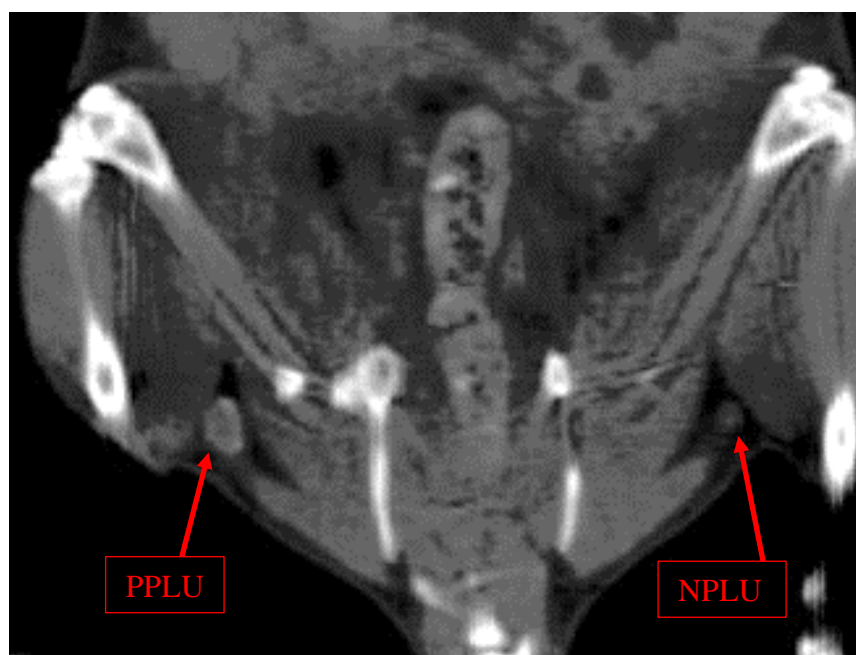
Nanočastice typu MG116 sa úspešne akumulovali v pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzline, na základe čoho ju bolo možné úspešne identifikovať behom pitevnej disekcie nielen zdravých myší (vid' obr. 13) ale aj B16-F10 nádorových myší (vid' obr. 15). Týmto sme preukázali využiteľnosť nanočastíc typu MG116 pri intraoperačnom výkone, keďže pozitívna popliteálna lymfatická uzlina je voľným okom jasne rozlíšiteľná od okolitého tkaniva.



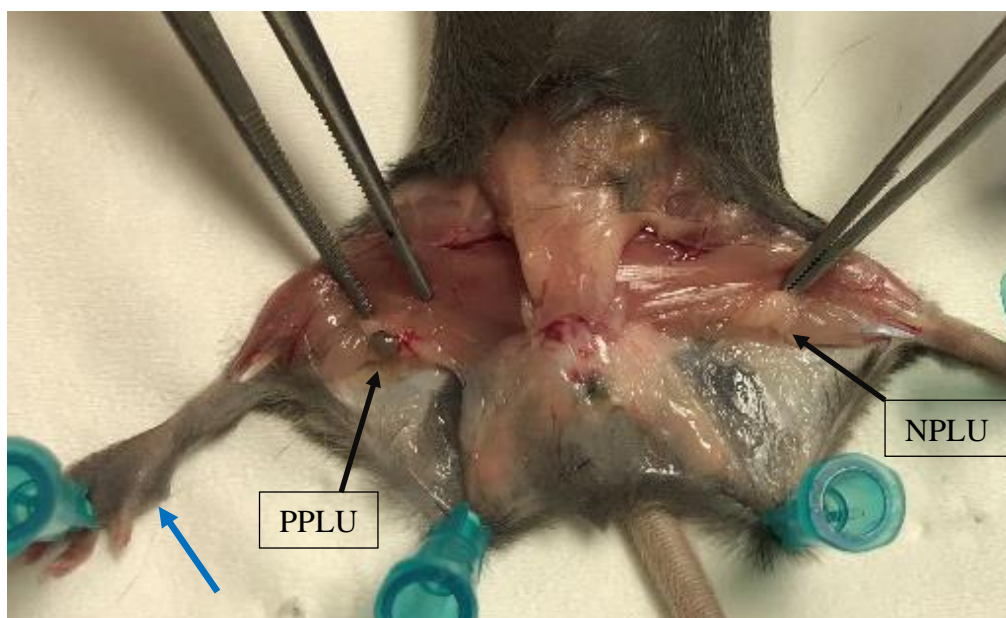
Obr. 12 CT snímka zdravej myši s MG116 zhotovená 24h p.i. porovnávajúca pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu – vyobrazenú v ľavej časti, negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu vyobrazenú vpravo, každá z nich je zvýraznená príslušnou červenou šípkou.



Obr. 13 Fotografia z vykonanej pitvy zdravej myši s aplikovanými nanočasticami MG116; PPLU označuje pozitívnu, teda pravú popliteálnu lymfatickú uzlinu a NPLU označuje miesto výskytu negatívnej, teda ľavej popliteálnej lymfatickej uzliny. Autor fotografie: Hajduová Katarína.



Obr. 14 CT snímka myši s tumorom bunkovej línie B16-F10 a aplikovanými nanočasticami MG116, červená šípka v ľavej časti snímky zvyrazňuje pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a v pravej časti snímky zvyrazňuje červená šípka negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU).

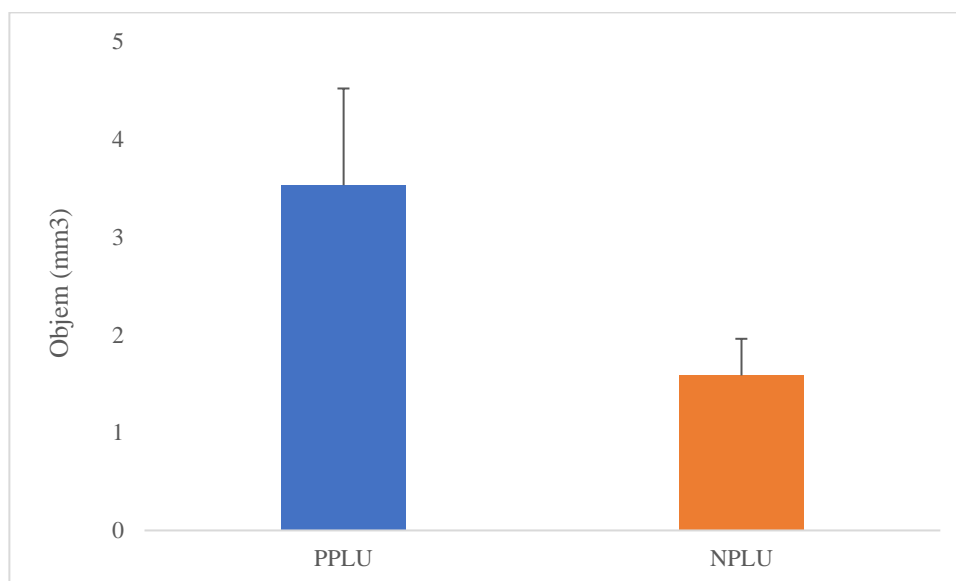


Obr.15 Fotografia z vykonanej pitvy nádorovej myši s tumorom bunkovej línie B16-F10 s aplikovanými nanočasticami MG116; modrá šípka v ľavej časti označuje tumor, PPLU značí pozitívnu, teda pravú popliteálnu lymfatickú uzlinu a NPLU značí miesto výskytu negatívnej, teda ľavej popliteálnej lymfatickej uzliny. Autor fotografie: Zbyněk Nový

4.1.2 Nanočastice MG117

4.1.2.1 Stanovenie veľkosti a rádiodenzity lymfatických uzlín

Graf 6 znázorňuje porovnanie priemerného objemu pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) v zdravých myšiach 24h p.i., po subkutánnej aplikácii MG117. Objem PPLU bol v priemere $3,53 \pm 0,99 \text{ mm}^3$ a objem NPLU bol v priemere $1,59 \pm 0,37 \text{ mm}^3$.

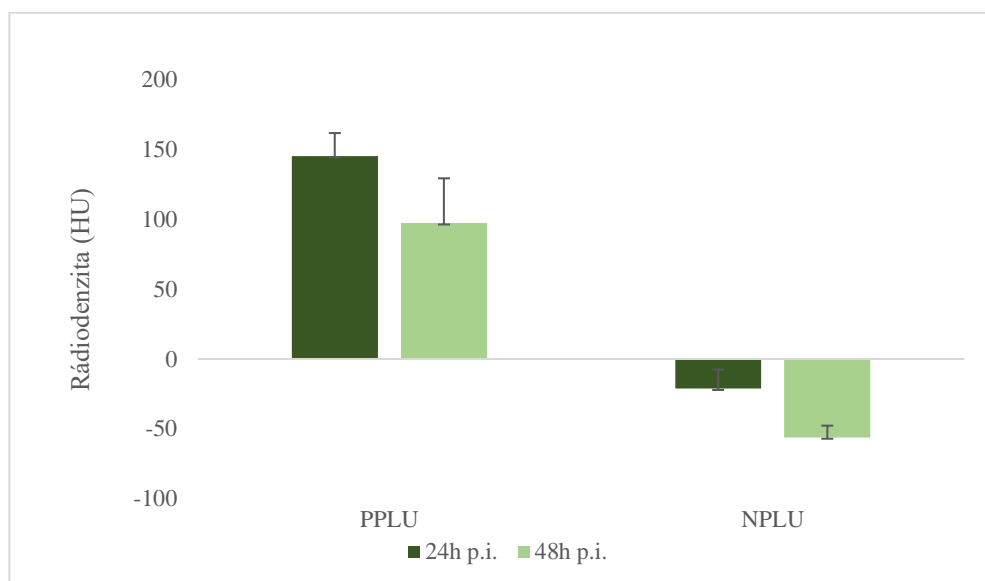


Graf 6 Priemerný objem pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, údaje zo zdravých myší (n=3) 24h po subkutánnej aplikácii MG117.

Na grafe 7 uvádzame priemerné hodnoty rádiodenzity (HU) pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín - PPLU a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín - NPLU \pm ich smerodajné odchýlky v čase 24h p.i. a 48h p.i. zlatých nanočastíc MG117 v zdravých myšiach, pri počte kusov n=3.

Zlepšenie kontrastu na CT snímke sme vypočítali ako rozdiel hodnôt rádiodenzity PPLU a NPLU a následne bola hodnota spriemerovaná a vypočítaná jej smerodajná odchýlka. Manozylované zlaté nanočastice, MG117 v experimentoch zvyšovali kontrast (vypočítané ako rádiodenzita PPLU-NPLU a následne bola hodnota spriemerovaná) PPLU v porovnaní s NPLU na CT snímkach vyhotovených 24h od aplikácie v priemere o $166,58 \pm 3,50 \text{ HU}$ (n=3) a 48h od aplikácie v priemere o $153,42 \pm 38,90$ (n=3). Na základe štatistickej analýzy konštatujeme, že aplikácia nanočastíc MG117 mala

štatisticky významnejší vplyv na zvýšenie kontrastu PPLU oproti uzlinám bez nanočastíc 24h p.i. ($p < 0,0005$) ako 48h p.i. ($p < 0,005$).

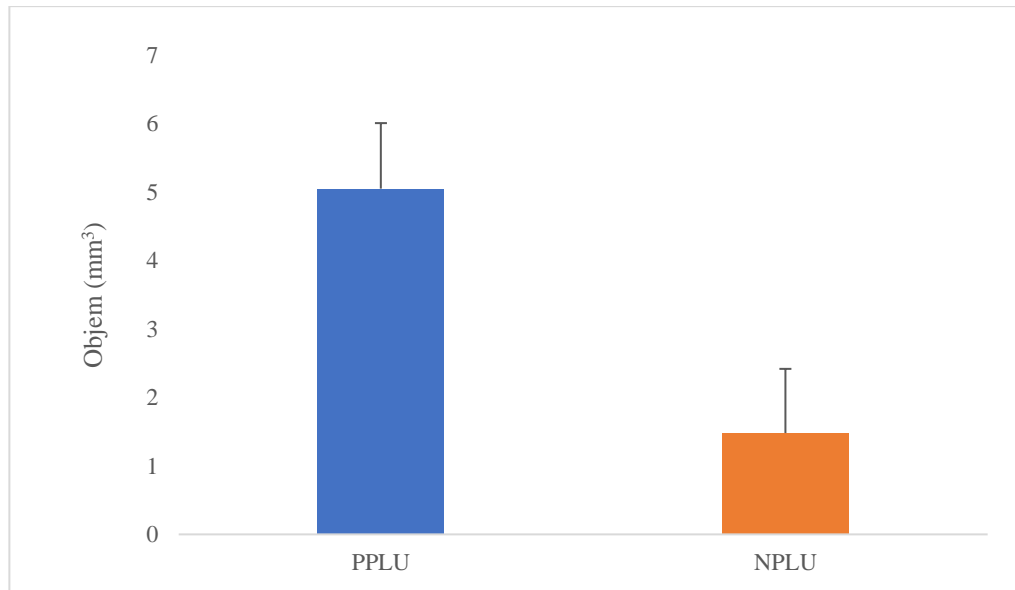


Graf 7 Porovnanie priemerných hodnôt rádiodenzity pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, uvedené údaje zo zdravých myši ($n=3$) po subkutánnej aplikácii MG117, v časoch 24h a 48h p.i..

B16–F10 nádorové myši:

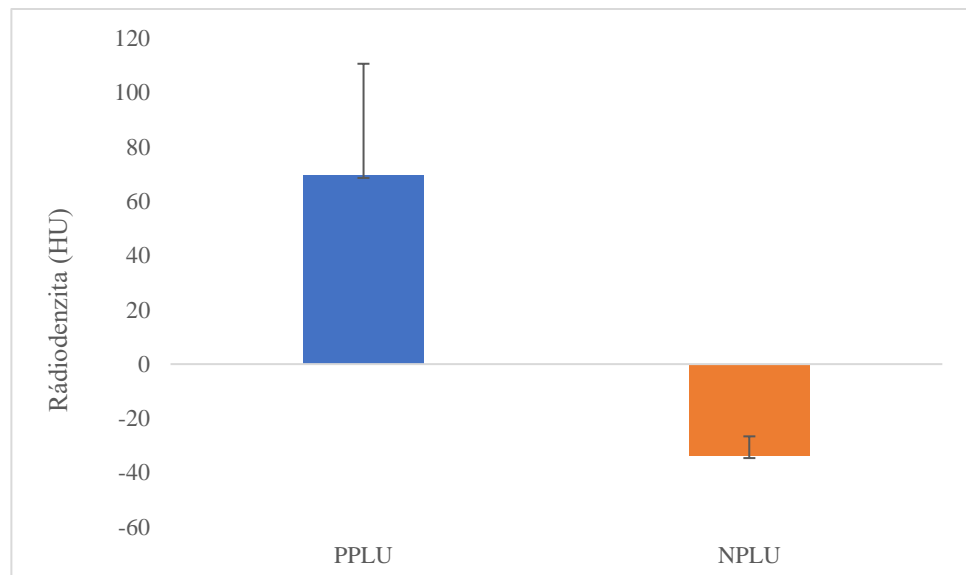
CT sken prebehol len v čase 24h p.i., nakoľko sme na zdravých kusoch overili, že je to najvhodnejší čas pre jeho vykonanie.

Na grafe 8 pozorujeme priemerné objemy pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny v myšiach s nádorom z implantovaných buniek B16-F10, s intratumorálne aplikovanými zlatými nanočasticami MG117. Priemerný objem pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny bol $5,05 \pm 0,96 \text{ mm}^3$. Naproti tomu objem negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny bol v priemere $1,48 \pm 0,94 \text{ mm}^3$. Objem pozitívnych popliteálnych uzlín bol v priemere viac ako trojnásobný ako objem negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín.



Graf 8 Priemerný objem pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (PPLU) a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, uvedené údaje sú z B16-F10 nádorových myší (n=5) 24h po intratumorálnej aplikácii MG117

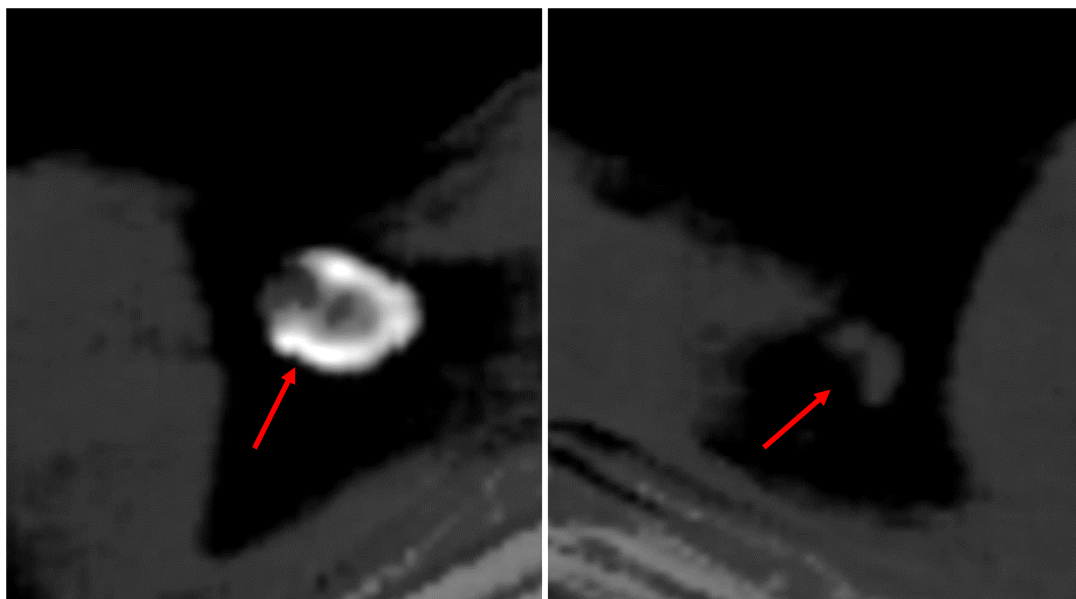
Ako ilustruje graf 9, rádiodenzita popliteálnych lymfatických uzlín po aplikácii MG117, 24h p.i. v nádorových B16-F10 myšiach bola v prípade PPLU v priemere $69,56 \pm 41,06$ HU a rádiodenzita NPLU bola v priemere $-33,61 \pm 7,00$ HU. Štatisticky vyjadrené, hodnota rádiodenzity PPLU bola štatisticky signifikantne vyššia ($p < 0,005$) ako hodnota rádiodenzity NPLU.



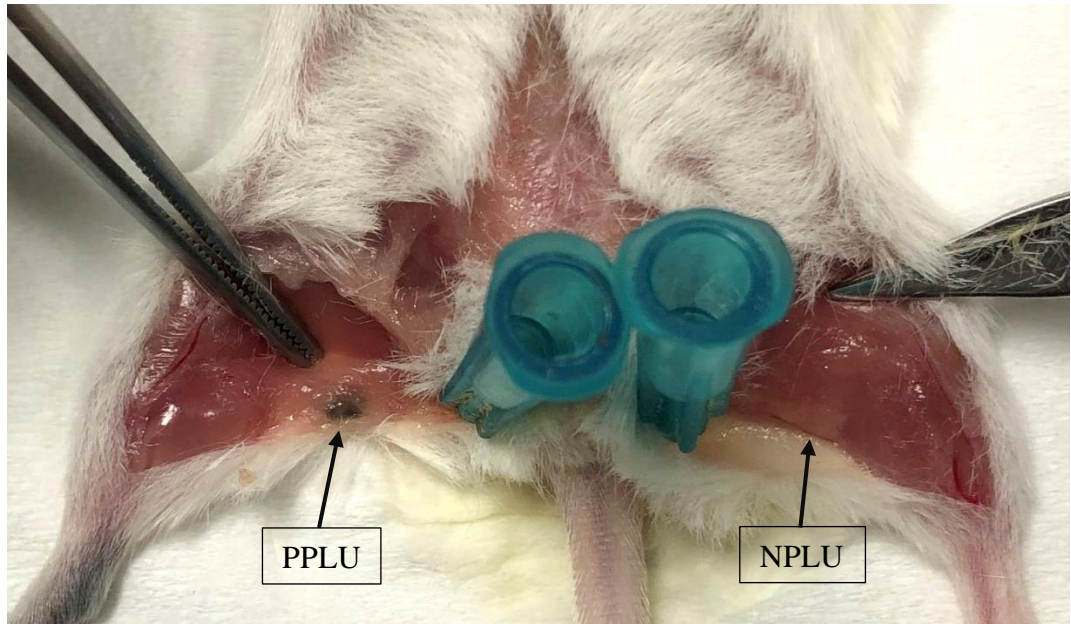
Graf 9 Porovnanie priemerných hodnôt rádiodenzity pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín (PPLU) a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín (NPLU) \pm ich smerodajné odchýlky, uvedené údaje z B16-F10 nádorových myší (n=5) po intratumorálnej aplikácii MG117, v čase 24h p.i.

4.1.2.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín

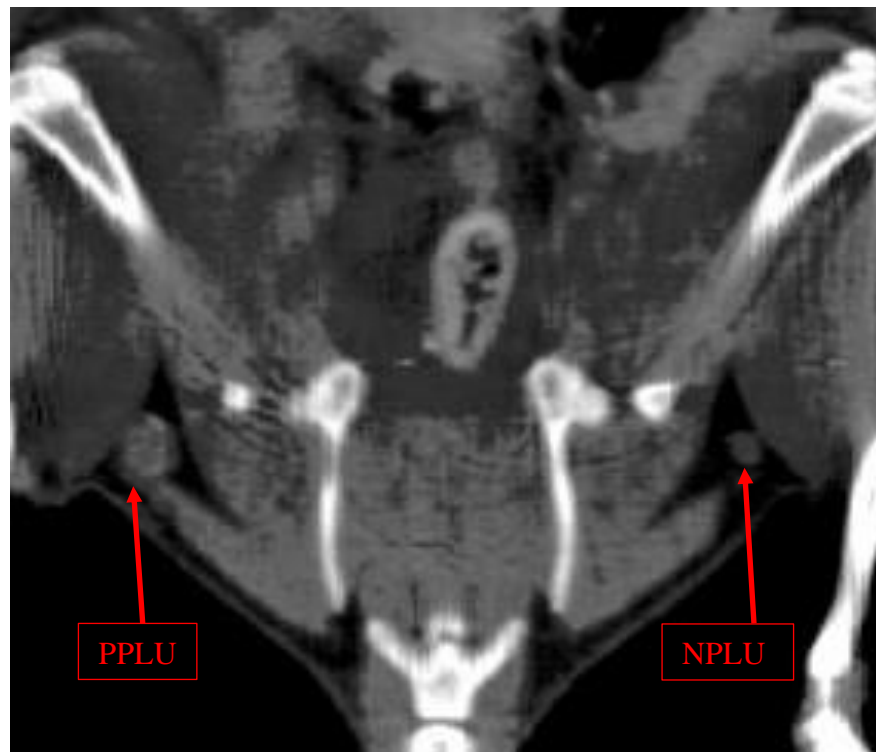
Ako môžeme vidieť, zlaté nanočastice typu MG117 dokázali efektívne zvýšiť kontrast danej popliteálnej lymfatickej uzliny na CT snímke zdravej myši (obr. 16). Taktiež sa preukázala aj ich schopnosť sfarbenia popliteálnej lymfatickej uzliny, spôsobená ich akumuláciou v jej subkapsulárnych sínusoch aj pri pitevnej disekcii danej zdravej myši (vid' obr. 17).



Obr. 16 CT snímka zdravej myši s aplikovanými MG117 zhotovená 24h p.i. porovnávajúca pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu – vyobrazenú v ľavej časti a negatívu popliteálnu lymfatickú uzlinu vyobrazenú vpravo, každá z nich je zvýraznená príslušnou červenou šípkou.



Obr. 17 Fotografia z vykonanej pitvy zdravej myši s aplikovanými nanočasticami MG117; PPLU značí pozitívnu, teda pravú popliteálnu lymfatickú uzlinu a NPLU označuje miesto výskytu negatívnej, teda ľavej popliteálnej lymfatickej uzliny. Autor fotografie: Hajduová Katarína



Obr. 18 CT snímka myši s tumorom bunkovej línie B16-F10, vyhotovená 24h.p.i MG117, červená šípka v ľavej časti snímky zvyrazňuje pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a v pravej časti snímky zvyrazňuje červená šípka negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU).



Obr. 19 Fotografia z vykonanej pitvy nádorovej myši s tumorom bunkovej línie B16-F10 s aplikovanými nanočasticami MG117; modrá šípka v ľavej časti označuje tumor, PPLU značí pozitívnu, teda pravú popliteálnu lymfatickú uzlinu a NPLU značí miesto výskytu negatívnej, teda ľavej popliteálnej lymfatickej uzliny. Autor fotografie: Zbyněk Nový

Rovnako ako v zdravých jedincoch sa schopnosť akumulácie MG117, a tým aj ich schopnosť zvýšenia kontrastu voči okolitému tkanivu preukázala aj na CT snímkach B16-F10 nádorovej myši (viď obr. 18). Taktiež schopnosť vizuálne farebne označiť požadovanú sentinelovú lymfatickú uzlinu sme úspešne preukázali, ako dokazuje obr. 19.

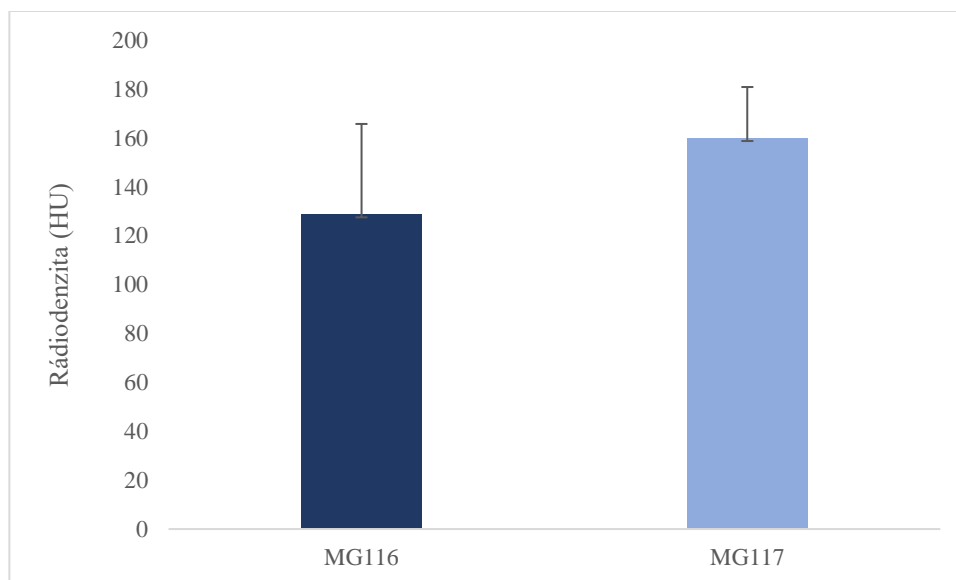
4.1.3 Porovnanie podtypov MG116 a MG117

Graf 10, kde sú vyobrazené údaje pre zdravé myši a graf 11, ktorý vyobrazuje údaje pre B16-F10 nádorové myši, zobrazujú priemerný rozdiel rádiodenzity pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny pri aplikácii MG116 a MG117, teda hodnotu, o ktorú aplikované nanočastice zvyšujú rádiodenzitu pozitívnych popliteálnych uzlín v porovnaní s ich negatívnymi náprotivkami. V grafoch sú uvedené hodnoty priemerných rozdielov 24h p.i..

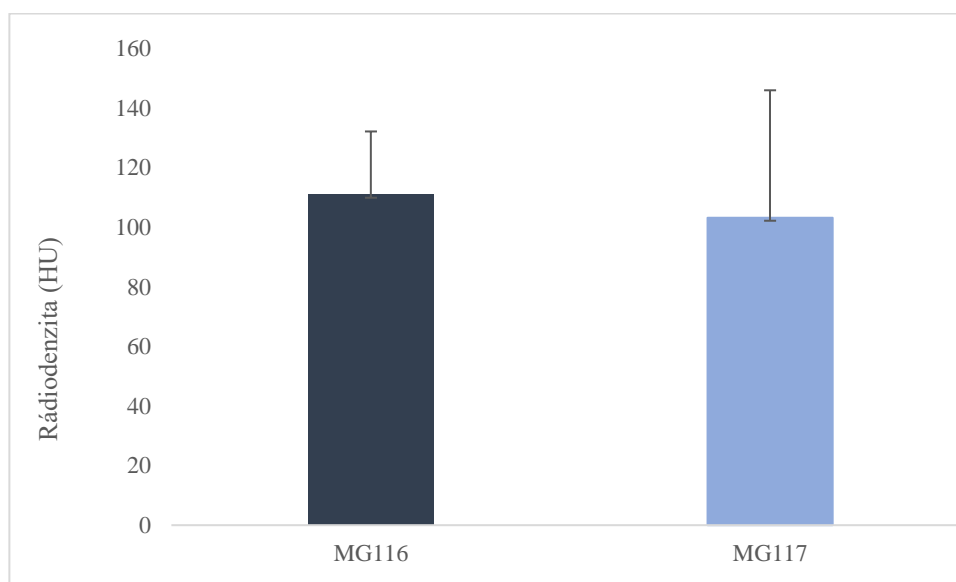
Pri použití MG116 dosahovala priemerná hodnota rozdielu rádiodenzity $121,81 \pm 38,54$ HU v zdravých myšiach a v B16-F10 nádorových jedincoch bola táto hodnota $110,88 \pm 21,26$ HU. Analogické výsledky pri použití MG117 boli $166,58 \pm 3,50$ HU v zdravých myšiach a $103,17 \pm 42,78$ HU v B16-F10 nádorových myšiach.

Hodnoty rozdielov rádiodenzity sme následne podrobili jednosmernému študentovmu t-testu, aby sme zistili, či sú MG117 štatisticky lepšou voľbou pre zvýšenie kontrastu zobrazovanej PPLU než MG116. Výsledky štatistickej analýzy ukázali, že MG117 nie sú

významne efektívnejšie vo zvýšení kontrastu, a teda v zlepšení viditeľnosti na CT snímke, ako MG116 ani v zdravom modeli ($p \geq 0,5$) ani v B16-F10 nádorovom modeli ($p \geq 0,5$).



Graf 10 Priemerný vypočítaný rozdiel medzi hodnotami rádiodenzity negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny a pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny \pm ich smerodajné odchýlky v zdravých myšiach pri použití MG116 a MG117; boli použité hodnoty z meraní 24h p.i., pri počte myší v každej vzorke $n=3$



Graf 11 Priemerný vypočítaný rozdiel medzi hodnotami rádiodenzity negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny a pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny \pm ich smerodajné odchýlky v B16-F10 nádorových myšiach pri použití MG116 a MG117; boli použité hodnoty z meraní 24h p.i., pri počte myší v každej vzorke $n=5$

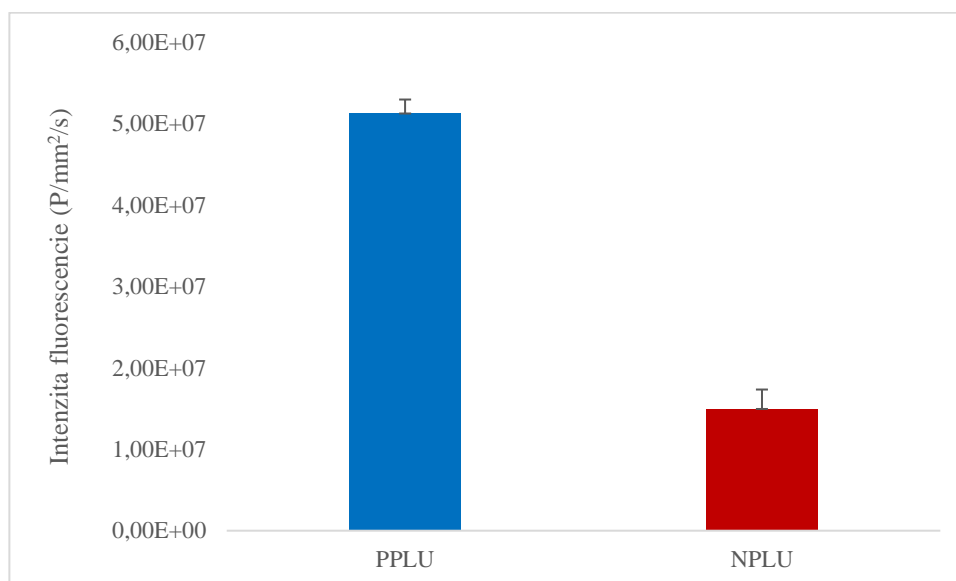
4.2 Diamantové nanočastice

Pre účely fluorescenčného označenia popliteálnych lymfatických uzlín sme použili vysoko koloidne stabilné HPHT FND s veľkosťou ~ 200 nm, ktoré poskytujú ultra jasné dvojfarebné emisie v blízkej infračervenej oblasti a vo viditeľných spektrálnych oblastiach. Po excitácii zeleným (532 nm) a oranžovým (590 nm) svetlom FND emitujú v oblasti 560 - 800 nm. Excitácia modrým svetlom (488 nm) vedie k zelenej (500 - 550 nm) emisii, ktorú je možné paralelne využiť na nezávislú spektrálnu detekciu FND s intraoperačným využitím.

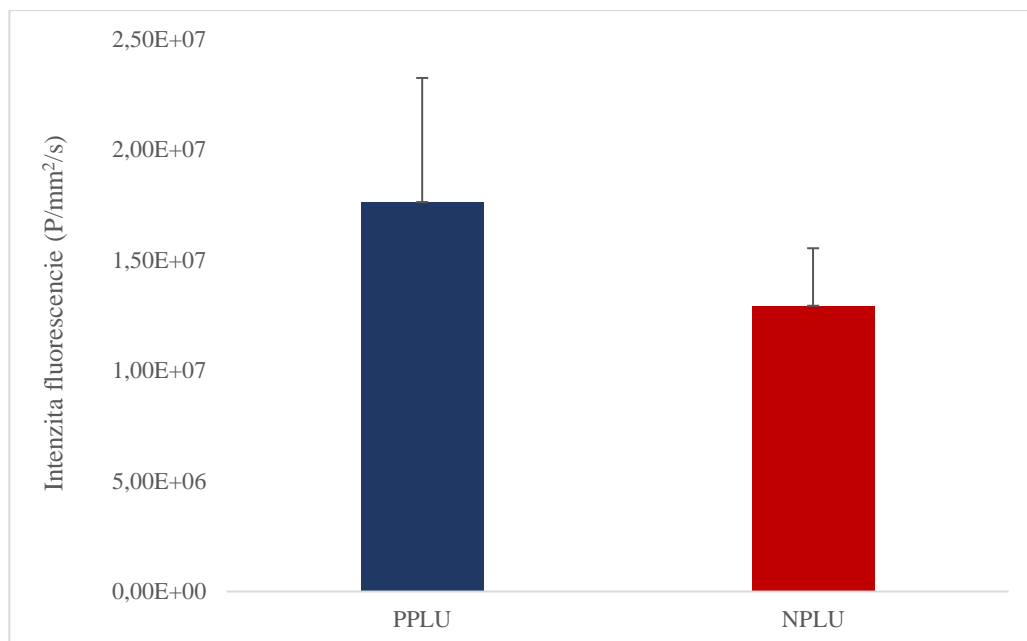
4.2.1 Nanočastice KK69

4.2.1.1 Stanovenie intenzity fluorescence

Hodnoty fluorescence HPHT nanodiamantov v PPLU dosahovali v zdravých myšiach priemerné hodnoty $5,15 \times 10^7 \pm 1,71 \times 10^6$ P/mm²/s (vid' graf 12) a v nádorových B16-F10 myšiach boli tieto hodnoty v priemere $1,76 \times 10^7 \pm 5,62 \times 10^6$ P/mm²/s (vid' graf 13).



Graf 12 Hodnoty fluorescence v zdravom modeli s aplikovanými KK69 pre pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU), hodnoty získané 24h p.i., pri počte myší n=5

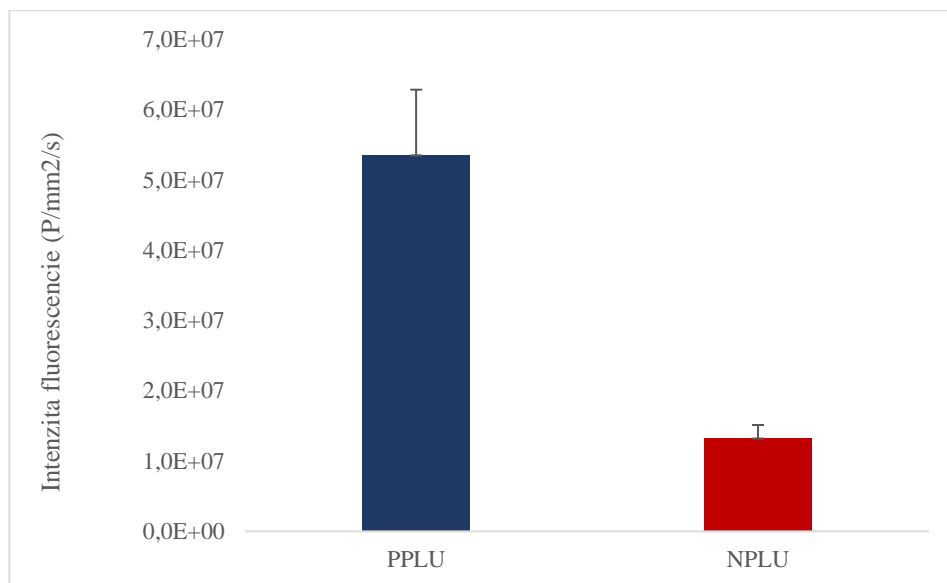


Graf 13 Hodnoty fluorescence v B16-F10 nádorovom modeli s aplikovanými KK69 pre pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU), hodnoty získané 24h p.i., pri počte myší n=4

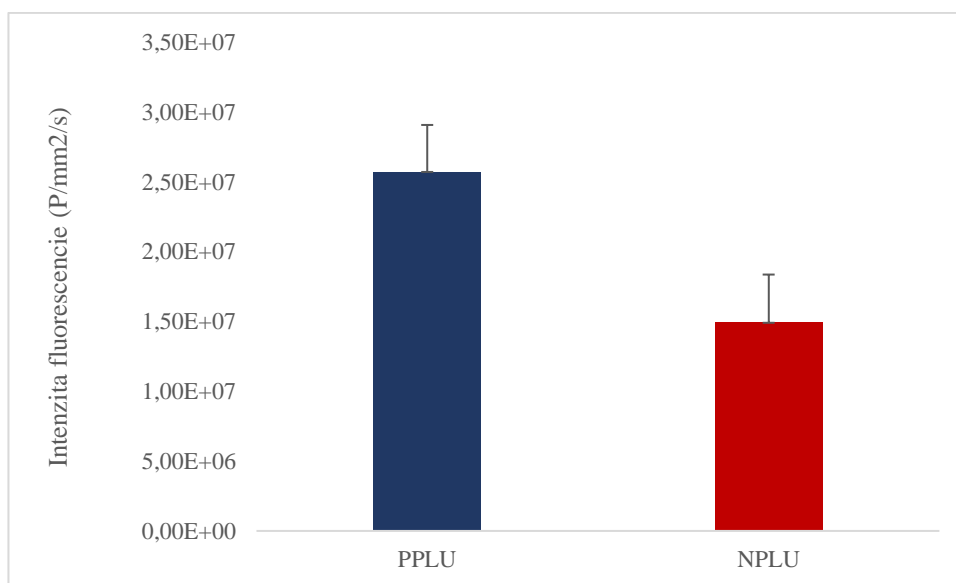
4.2.2 Nanočastice KK70

4.2.2.1 Stanovenie intenzity fluorescence

Typ KK70 HPHT nanodiamantov vykazoval v zdravom modeli pri počte myší n=5 priemerné hodnoty fluorescence $5,40 \times 10^7 \pm 9,35 \times 10^6$ P/mm²/s (vid' graf 14) a v nádorovom B16-F10 modeli, pri počte myší n=4, boli priemerné hodnoty fluorescence PPLU $2,57 \times 10^7 \pm 3,37 \times 10^6$ P/mm²/s (vid' graf 15).



Graf 14 Priemerné hodnoty fluorescence v zdravých myšiach s aplikovanými KK70 pre pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU), hodnoty získané 24h p.i., pri počte myší n=5



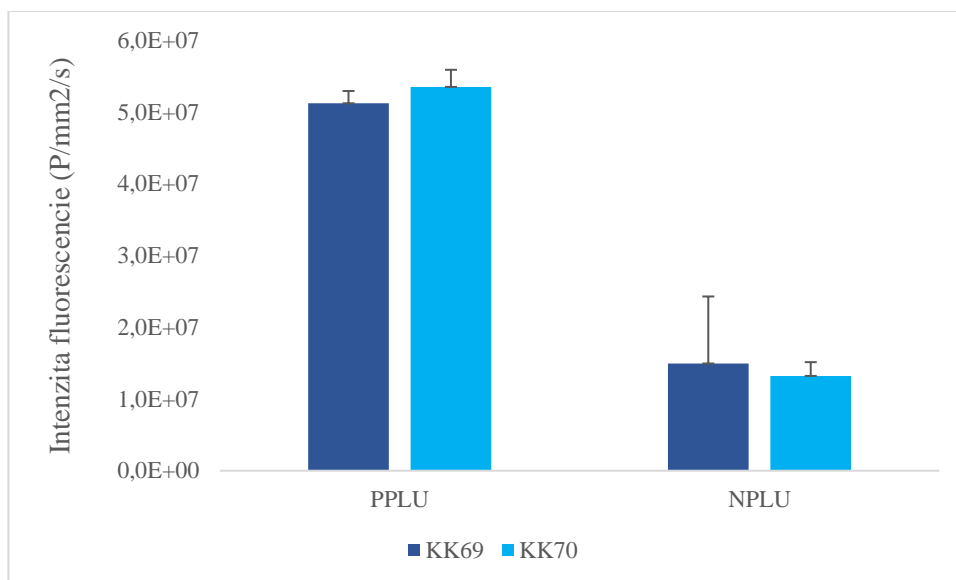
Graf 15 Priemerné hodnoty fluorescence v nádorovom B16-F10 modeli s aplikovanými KK70 pre pozitívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (PPLU) a negatívnu popliteálnu lymfatickú uzlinu (NPLU), hodnoty získané 24h p.i., pri počte myší n=4

4.2.3 Porovnanie podtypov KK69 a KK70

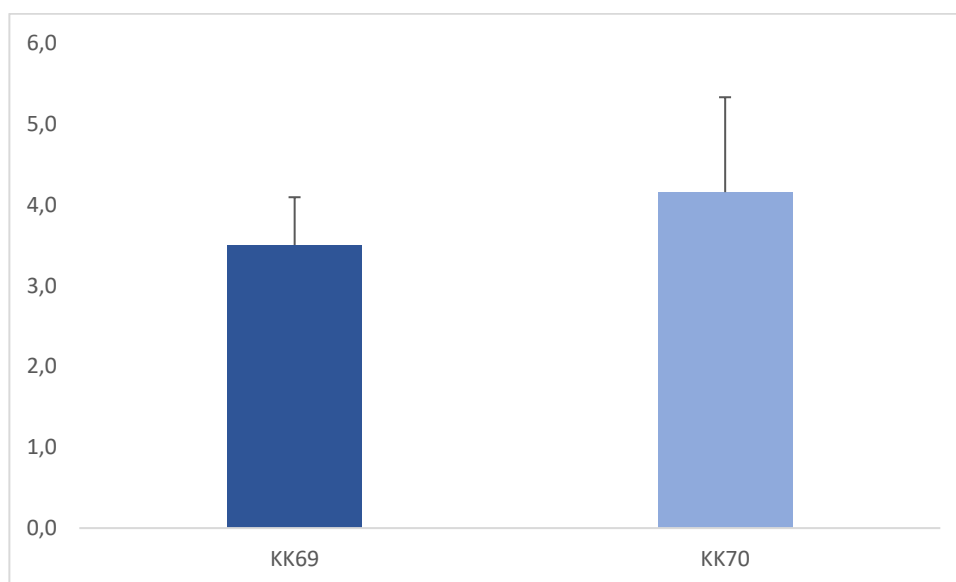
4.2.3.1 Stanovenie intenzity fluorescence

Intenzita fluorescence v PPLU v zdravých myšiach pre KK69 bola v priemere $5,1 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^6$ P/s/mm² a pre KK70 bola táto hodnota v priemere $5,4 \times 10^7 \pm 9,4 \times 10^6$ P/s/mm². Obe tieto hodnoty sú signifikantne vyššie ($p < 0,0005$) v

porovnaní s NPLU kde hodnoty intenzity fluorescenčního signálu dosahovali $1.5 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^6$ P/s/mm² pre KK69 a $1,3 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^6$ P/s/mm² pre KK70 (vid' graf 16).



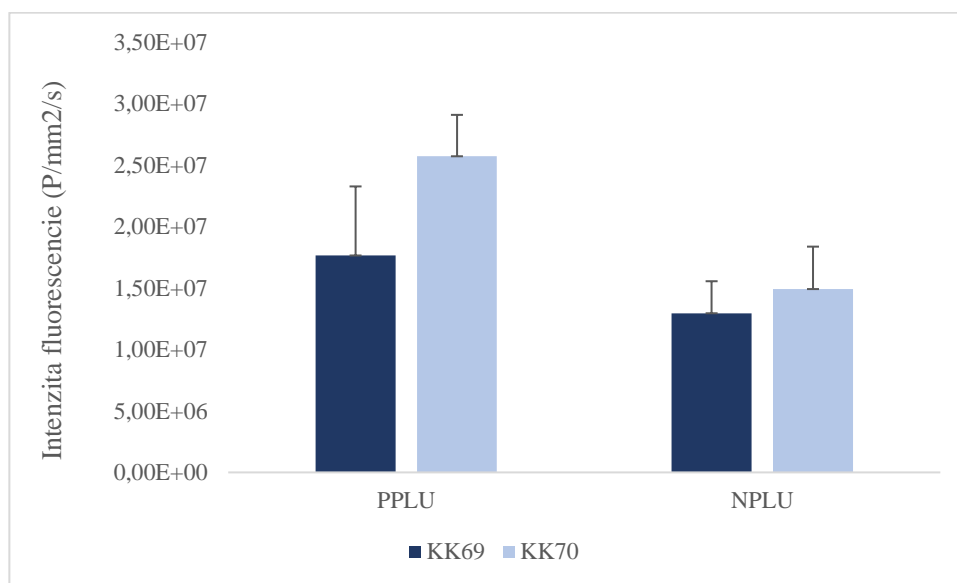
Graf 16 Porovnanie priemerných hodnôt fluorescence PPLU a s obsahom buď KK69 alebo KK70 a porovnanie priemerných hodnôt fluorescence NPLU v zdravých myšiach pri počte kusov n=5



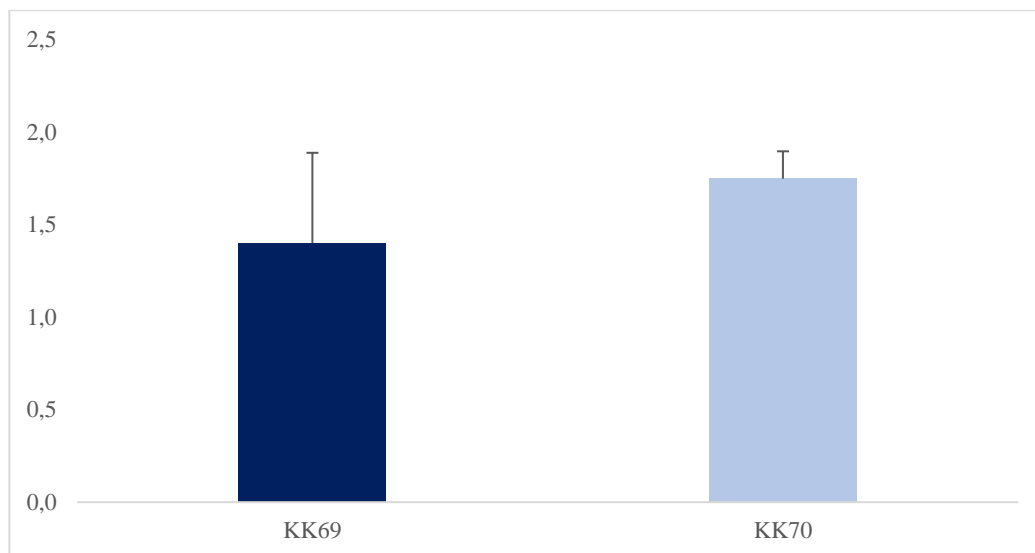
Graf 17 Pomer hodnoty intenzity fluorescence pozitívnej/negatívnej PLU pre KK69 a KK70 v zdravých myšiach, 24h p.i. n=5

Pri porovnaní hodnôt fluorescence pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlín v zdravom modeli (n=5) (viď graf 16) vidíme, že manozilyované KK70 štatisticky významne nezvyšili hodnotu fluorescence ($p < 0,5$) oproti nemanozilyvaným KK69.

KK69 zvyšovali intenzitu fluorescence pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny v priemere 3,5-násobne oproti intenzite fluorescence negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny. V prípade KK70 bola hodnota priemerného zvýšenia fluorescence pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny v porovnaní s jej negatívnym náprotivkom v priemere 4,16-násobná (viď obe graf 17).



Graf 18 Porovnanie priemerných hodnôt fluorescence v nádorovom B16-F10 modeli 24h p.i. PPLU s obsahom buď KK69 alebo KK70 a porovnanie priemerných hodnôt fluorescence NPLU \pm smerodajná odchýlka, bez obsahu nanočastíc, n=4



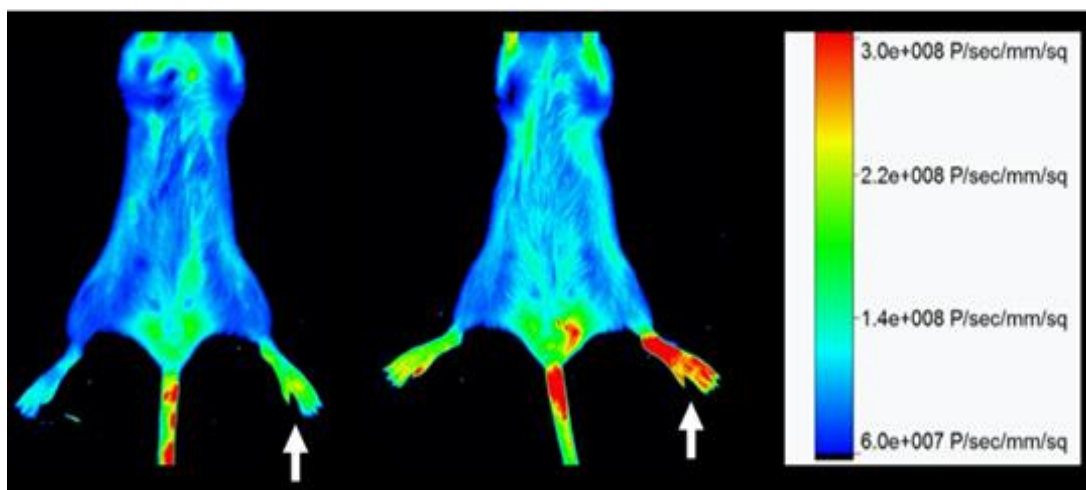
Graf 19 Pomer hodnoty intenzity fluorescence pozitívnej/negatívnej PLU pre KK69 a KK70 v B16-F10 nádorovom modeli, 24h p.i. n=4

Ak rovnako ako pri zdravom modeli porovnáme hodnoty pomeru fluorescence pozitívnych a negatívnych popliteálnych lymfatických uzlín pri použití nanočastíc KK69 a KK70, v nádorovom B16-F10 modeli (viď graf 19), dedukujeme, že fluorescenčné nanodiamanty typu KK70 disponujúce manózovou modifikáciou, vykazovali štatisticky signifikantne vyššie hodnoty ($p < 0,05$) ako pozitívne popliteálne lymfatické uzliny obsahujúce KK69.

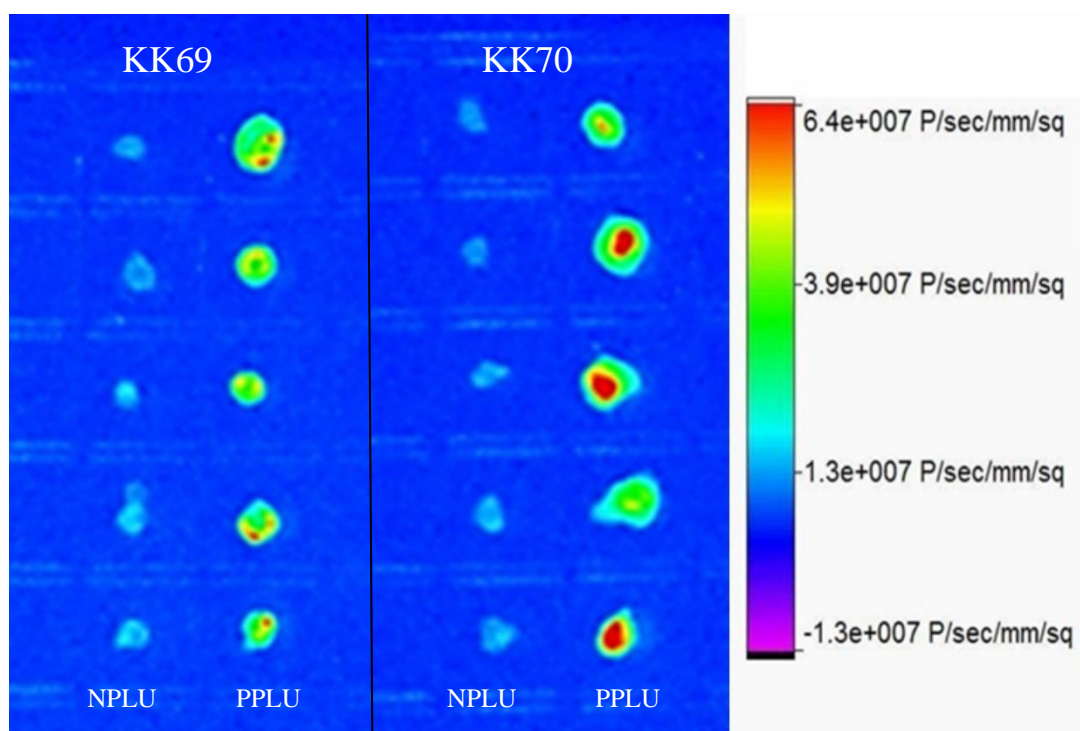
4.2.3.2 Zobrazovanie lymfatických uzlín

Obr. 20 znázorňuje celkovú snímku fluorescence danej myši, pričom máme možnosť vidieť, že KK70 sa akumulovali vo väčšej miere v mieste aplikácie, ako KK69. Dané fluorescenčné hodnoty popliteálnych lymfatických uzlín nie je možné z této snímky s istotou určiť, nakoľko autofluorescencia tkaniva a srsti ruší ich fluorescenčný signál, čo je aj dôvod, prečo obdobná snímka pre B16-F10 nádorové myši nie je vložená.

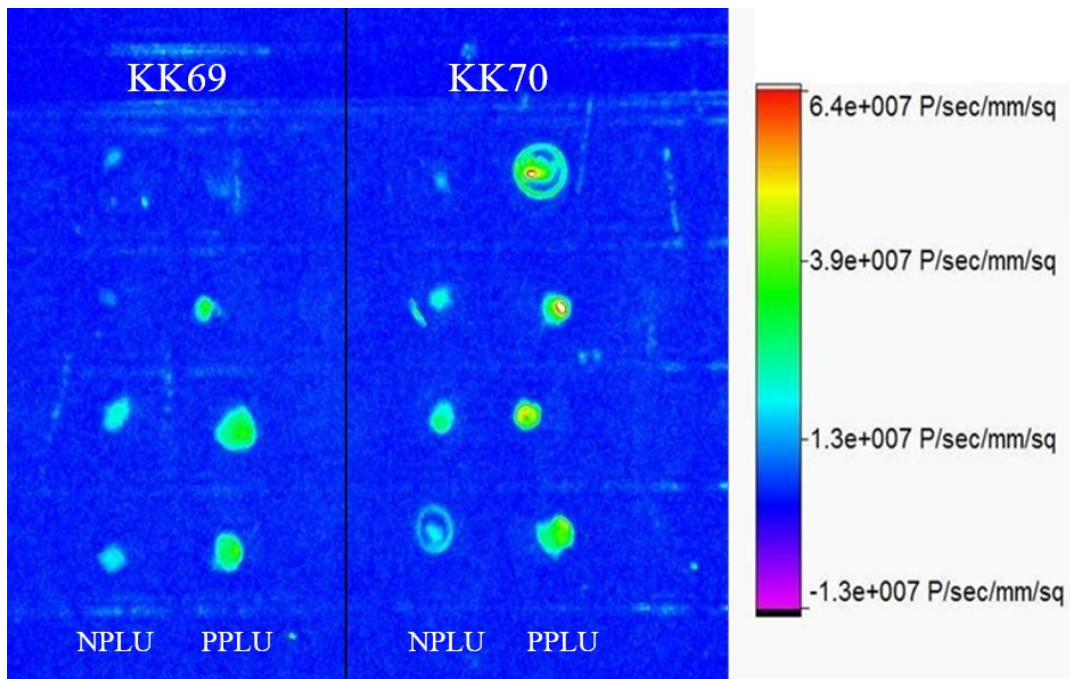
Pre efektívnejšiu kvantifikáciu popliteálnych uzlín, ich bolo potrebné z danej myši excizovať *post mortem* a následne zosnímať umiestnené v mikrotitračnej doštičke s nízkou mierou autofluorescencie, ako môžeme vidieť na obr. 21 a 22.



Obr. 20 Celková fluorescenčná snímka zdravých myší s KK69 – vľavo a KK70 – vpravo. Šípky zvyrazňujú miesto aplikácie daných fluorescenčných nanodiamantov. Snímka bola vyhotovená 24h p.i.



Obr. 21 Fluorescenčné zobrazenie jednotlivých excizovaných popliteálnych lymfatických uzlín zo zdravých myší, vyhotovené 24h p.i.. Snímka je rozdelená do dvoch častí, oddelených medzníkom, pričom ľavá časť zobrazuje popliteálne lymfatické uzliny myší s KK69 a pravá časť zobrazuje popliteálne lymfatické uzliny myší s KK70. Negatívne popliteálne lymfatické uzliny (NPLU) sú vždy vyobrazené v prvom stĺpci a pozitívne popliteálne lymfatické uzliny (PPLU) v druhom stĺpci danej časti snímky, LU sú vždy zoradené zostupne myš č.1-5.



Obr. 22 Fluorescenčné zobrazenie jednotlivých excizovaných popliteálnych lymfatických uzlín z myši s tumorom B16-F10, vyhotovené 24h p.i.. Snímka je rozdelená do dvoch častí, oddelených medzníkom, pričom ľavá časť zobrazuje popliteálne lymfatické uzliny myši s KK69 a pravá časť zobrazuje popliteálne lymfatické uzliny myši s KK70. Negatívne popliteálne lymfatické uzliny (NPLU) sú vždy vyobrazené v prvom stĺpci a pozitívne popliteálne lymfatické uzliny (PPLU) v druhom stĺpci danej časti snímky. PLU sú vždy zoradené zostupne myš č.1-4.

5 DISKUSIA

Rakovinové metastázy predstavujú celosvetovo hlavný dôvod až 90% úmrtí na toto ochorenie. Bez ohľadu na konkrétny druh rakoviny, len jeden z piatich pacientov s metastázujúcim štádiom sa dožíva dlhšie ako päť rokov od diagnózy, čo len podtrhuje komplexnosť tohto ochorenia (Schroeder *et al.*, 2012).

Pre mnoho typov karcinómov ako napríklad prsníka, prostaty, či pľúc, je lymfogénne metastázovanie nádorov do ďalších tkanív hlavným dôvodom smrti pacientov, z tohto dôvodu je dôležité určiť príslušnú SLU a určiť štádium ochorenia a následne vhodne zvoliť liečbu (Neoral a Bohanes, 2012).

Potreba vyvinúť ľahko dostupné metódy pre vizualizáciu SLU je zameraná na dva hlavné parametre. Prvým z nich je bezpečnosť pacienta a zdravotníckeho personálu, a teda potreba vyvinúť biokompatibilné, netoxické kontrastné látky, ktoré však nebudú vystavovať ani pacienta, ani chirurgický personál riziku, napríklad vo forme gama žiarenia.

Druhým dôležitým parametrom, je potreba vyvinúť také kontrastné látky, aby ich implementácia v praxi bola čo najjednoduchšia a aby sa podľa možnosti dalo využiť už existujúce prístrojové vybavenie, ktorým disponuje väčšina zdravotníckych zariadení.

Ako dostupná a efektívna metóda zobrazovania sa pre toto využitie ponúka napríklad počítačová tomografia, ktorá využíva rozdiel absorpcie rôznych tkanív na vytváranie obrazov telesných štruktúr. (Carlsson, 1999). CT má porovnateľné kvality ako ostatné techniky pre vyhotovenie 3D snímok tela.

Avšak z dôvodu absencie prirodzeného kontrastu niektorých štruktúr resp. tkanív s ich okolím, je potrebné zaviesť do organizmu kontrastnú látku. Kvalita kontrastných látok sa určuje najmä na ich schopnosti zvyšovať kontrast. Pri výbere a tvorbe ideálneho kontrastného agens, sa kladie dôraz nielen na vysokú kontrastnú hustotu a nízku toxicitu, avšak i na jednoduchosť jeho aplikácie a cenovú reláciu (Li *et al.*, 2015).

V súčasnosti sú najbežnejšie používané kontrastné látky pre CT organické molekuly obsahujúce jód, napríklad iopamidol, ako sme uviedli v predchádzajúcich kapitolách. Tieto kontrastné látky však disponujú viacerými nevýhodami, ktoré vytvárajú priestor pre vývoj nových a dokonalejších kontrastných látok. Spomedzi nevýhod je to napríklad krátky časový zobrazovací úsek, nakoľko sú tieto látky rýchlo vyplavované do obličiek a pečene. Táto nevýhoda však môže byť aspoň čiastočne odstránená modifikáciou konvenčných zobrazovacích agens pomocou lipozómov (Lim *et al.*, 2010). Spomínaná

modifikácia však vyrieši len jeden z problémov, stále pretrváva problém toxicity voči obličkám a taktiež pravdepodobnosť vzniku alergických reakcií. (Xi *et al.*, 2012).

Naproti tomu anorganické nanomateriály majú unikátne optické, elektrické a magnetické vlastnosti. Anorganické nanočastice na báze oxidu železa, kvantových bodiek a ušľachtilých kovov poskytujú veľké množstvo nových nanosond na neinvazívne mapovanie sentinelových lymfatických uzlín pre- alebo intra-operačne.

Z týchto dôvodov je veľmi výhodný koncept zlatých nanočastíc, ako kontrastných látok pre preoperačné CT zobrazovanie a intraoperačné zobrazovanie. Zlaté nanočastice sa javia ako ideálne kontrastné látky pre CT zobrazovanie, z dôvodu ich biokompatibility, vysokých absorpčných koeficientov röntgenových lúčov a ľahkosti povrchovej modifikácie, ktorá sa dá využiť pre cieleň špecifický príjem lymfatickými uzlinami ako napríklad pomocou manóзовého receptora (Uthaman *et al.*, 2018).

Receptor pre rozpoznanie manózy (*angl. mannose receptor*, MR; CD206) je transmembránový proteín veľký približne 175 kD, prevažne exprimovaný tkanivovými makrofágmi, dendritickými bunkami (*angl. dendritic cells*, DC) a vybranými lymfatickými alebo endotelovými bunkami (Taylor *et al.*, 2005). MR je detekovateľný v mnohých orgánoch vrátane sleziny, pečene a lymfatických uzlín (Azad *et al.*, 2015).

Makrofágy, najmä tie spojené s nádorovým bujnením, dendritické bunky a retikulárno-endotelové bunky prítomné v SLU exprimujú manóзовý receptor (MR; CD206) v hojných množstvách. Z tohto dôvodu už bolo navrhnutých niekoľko rádioaktívne značených molekulárnych látok obsahujúcich manózu zameraných na MR a zobrazovanie SLU (Azad *et al.*, 2015).

Manozyláciou zobrazovacích látok možno optimalizovať ich príjem, konkrétne jeho sprostredkovaním pomocou MR makrofágov, nachádzajúcich sa v cieľových tkanivách. Vzhľadom na schopnosť recyklácie MR sa predpokladá, že cieleň rozpoznávanie pomocou MR bude vyžadovať menšie dávky látok na dosiahnutie optimálnych klinických účinkov, čím sa zníži množstvo podávaných látok a v niektorých prípadoch, napríklad ak sa jedná o ^{99m}Tc , aj ich toxicita či celková biologická záťaž pre pacienta (Azad *et al.*, 2015).

Nami použité zlaté nanočastice disponujú okrem biokompatibility ešte navyše funkčnou vlastnosťou cieleňho aktívneho príjmu makrofágmi v LU, prostredníctvom MR, ktorý sprostredkováva v našom prípade monosacharid D-manóza.

Hlavným cieľom predkladanej bakalárskej práce bolo preskúmať novo vyvinuté zlaté nanočastice pre detekciu SLU. V experimentoch sme zisťovali, či sú nami skúmané

nanočastice vhodné pre detekciu SLU a či má modifikácia manózou, za účelom zvýšenia príjmu pomocou endocytózy, štatisticky signifikantný význam. Pracovali sme s dvoma typmi nanočastíc, pre selektívnu akumuláciu v SLU.

Nami posudzované zlaté aj diamantové nanočastice sme získali v spolupráci s ÚOCHAB AV ČR v Prahe.

Čo sa týka zlatých nanočastíc s priemernou veľkosťou 165 nm, nemáme vedomosť o tom, že by sa vykonávala štúdia za použitia zlatých nanočastíc tejto veľkosti, nakoľko optimálna veľkosť nanočastíc pre retenciu v SLU je podľa viacerých autorov cca 50 nm (Hameed, 2018).

V grafoch 1, 4, 6 a 8 sledujeme porovnanie objemu pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (PPLU) a negatívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (NPLU) v jednotlivých skupinách myší. Pozorujeme, že objem PPLU je u každej zo skupín myší zväčšený, pri zdravých jedincoch je to cirka dvojnásobné zväčšenie a pri nádorových jedincoch sa častokrát jedná o viacnásobné zväčšenie objemu oproti negatívnej kontrole - NPLU, čo spoľahlivo ukazuje retenciu nanočastíc v danej PPLU. Skutočnosť zväčšenia objemu PPLU zobrazuje napríklad aj obr. 12, kde vidíme porovnávaciu CT snímku zdravej myši č.1 s podanými MG116, pričom snímka bola vyhotovená 24 hodín od aplikácie nanočastíc a vodorovný rez zobrazuje obe uzliny v reze s ich najlepšou viditeľnosťou. Tieto výsledky dokazujú pozitívnu koreláciu medzi obsahom retenovaných nanočastíc v PLU a jej objemom.

Viacnásobné zväčšenie PPLU pri B16-F10 nádorových jedincoch oproti PPLU v zdravých je pravdepodobne spôsobené vlastnosťami B16 – F10 tumoru, ktoré opísali Harrell et al. vo svojej vedeckej práci zaoberajúcej sa vplyvom B16-F10 tumoru na lymfangiogenézu v popliteálnych lymfatických uzlinách. (Harrell, 2007). Podľa ich zistení, v skorých štádiách odpovede organizmu na rast tumoru nastáva značné zväčšenie popliteálnej lymfatickej uzliny v končatine, kde bol implantovaný tumor, konkrétne sú značne zväčšené lymfatické sínusy a medula. Toto zväčšenie sentinelovej uzliny nastáva ešte pred metastázovaním hlavného tumoru, respektíve pred detekovateľným množstvom metastatických buniek v danej SLU, do troch týždňov od implantácie B16–F10 buniek. Tieto zistenia teda naznačujú, že tumory podporujú expanziu lymfatických sínusov v SLU. Zväčšenie lymfatickej uzliny v dôsledku reakcie na prítomnosť tumoru nastáva čiastočne kvôli hromadeniu makrofágov, najmä TAM (*angl. tumor associated macrophages*, makrofágy súvisiace s nádorom) (Harrell et al., 2007).

Výsledky nám však ďalej ukazujú, že objemové zväčšenie PLU nie je priamo úmerné intenzite absorpcie röntgenového žiarenia (viď príloha napr. tabuľka 1, konkrétne myši č.1 a č.3, taktiež tabuľka 3, konkrétne myši č. 3 a č.5), čo potvrdzuje hypotézu, že zväčšenie uzlín u nádorových myší nie je spôsobené len akumuláciou nanočastíc ale aj vyššie popísaným efektom.

Zlaté nanočastice bez povrchovej úpravy manózou, t.j MG116, vykazovali zlepšenie kontrastu PPLU oproti NPLU na CT snímkach zdravých jedincov vyhotovených 24h od aplikácie v priemere o $121,81 \pm 38,54$ HU (n=3) (viď graf 3). Týmto sme potvrdili potencionálne využitie zlatých „nanoshells“ pre vizualizáciu LU, nakoľko boli na CT snímkach pomerne jednoducho odlišiteľné od okolitého tkaniva v porovnaní s LU bez obsahu nanočastíc, čo potvrdzuje aj obr. 12.

Rádiodenzita konkrétnych PPLU s aplikovanými MG116 v zdravých jedincoch mala klesavú tendenciu naprieč časom (viď graf 2). Hodnota rádiodenzity PPLU s aplikovanými MG117 mala taktiež klesavú tendenciu naprieč časom (viď graf 7), pričom 24h od aplikácie bola $145,41 \pm 16,39$ HU (n=3) a 48h od aplikácie bola $97,32 \pm 32,05$ HU (n=3). Z týchto hodnôt teda dedukujeme, že pre dosiahnutie lepších hodnôt zvýšenia kontrastu sa najvhodnejšie javí vykonať snímku 24h p.i..

Ako sme už uviedli, priemerná hodnota rozdielu absorpcie röntgenového žiarenia PPLU a NPLU v zdravých jedincoch, teda hodnota, o ktorú sa zvýšil kontrast PPLU na CT snímke oproti NPLU pre MG116 24h p.i bola $121,81 \pm 38,54$ HU (n=3) a pre MG117 bola rovnaká hodnota $166,58 \pm 3,50$ HU. Štatistická analýza výsledkov zo zdravých jedincov nám jasne hovorí, že častice obsahujúce modifikáciu manózou nevykazujú očakávané hodnoty a teda, nie sú ich kontrastné schopnosti v zdravom modeli signifikantne lepšie ($p \geq 0,5$) ako častíc bez manózovej modifikácie.

Tieto výsledky by sme čiastočne mohli porovnať s prácou Uthaman *et al.*, z roku 2018, kde boli použité zlaté nanočastice modifikované mananom, čo je bioaktívny polysacharid zložený z D-manózy. Tieto nanočastice mali však priemernú veľkosť $9,18 \pm 0,71$ nm, a jednalo sa o roztok koloidných nanočastíc zlata, avšak boli taktiež skúmané ako kontrastné médium pre selektívne CT zobrazovanie LU s použitím v myšom modeli. Rozdiel medzi zlatými nanočasticami použitými Uthaman *et al.* a nami použitými zlatými nanočasticami, je okrem ich veľkosti aj v stavbe, nami použité MG116 a MG117 disponujú kremíkovým jadrom vo veľkosti ~ 100 nm a vrstvou zlata hrubou ~ 63 nm.

Spôsob aplikácie v uvedenom experimente kolektívu Uthaman *et al.* bol zhodný s nami zvoleným spôsobom aplikácie, teda subkutánne do zadného chodidla.

Výsledkom zvolenia zlatých nanočastíc veľkosti $9,18 \pm 0,71$ nm bola ich retencia nielen v PLU, ale i v LU vyššieho rádu, konkrétne v inguinálnych LU. V štúdiu sa venovali porovnaniu mananom obohatených zlatých nanočastíc a citrátom obohatených zlatých nanočastíc, kedy nanočastice disponujúce mananom mali signifikantne vyššie hodnoty rádiodenzity ($p < 0,005$) v PPLU oproti nanočasticiam s citrátovou modifikáciou.

Rozdiel vo výsledkoch štúdie, ktoré ukazujú signifikantné zlepšenie príjmu a akumulácie nanočastíc obohatených o manan v PPLU a našich výsledkoch, si vysvetľujeme najmä rôznou veľkosťou nanočastíc. Domnievame sa, že veľkosť nami použitých nanočastíc je pre makrofágy prítomné v PLU rovnako prítlačivá bez štatisticky významného rozdielu pri povrchovej modifikácii.

Ďalšia príčina môže byť v použití mananu a D-manózy. Mannan vo svojej štruktúre obsahuje podjednotky D-manózy, takže je možné, že stimulácia receptorov je vyššia, nakoľko sa jedná o polysacharid, ide však len o našu domnienku.

Mimo iné, priemerná hodnota rádiodenzity v spomínanej štúdiu Uthaman et al. je až $618,33 \pm 80,31$ HU pre manozylované nanočastice, čo sa značne líši od nami nameraných hodnôt. Dôvod rozdielnej hodnoty rádiodenzity by sme videli hlavne v aplikačnej dávke zlatých nanočastíc, kedy v štúdiu bolo použité množstvo až $50 \mu\text{l}$ a v našom experimente bola aplikačná dávka vo veľkosti $20 \mu\text{l}$.

Avšak konštatujeme, že toto množstvo ($20 \mu\text{l}$) bolo dostatočné pre účely určenia danej lymfatickej uzliny a na CT snímkach bola jasne rozlíšiteľná od okolitého tkaniva (viď obr. 12 a 17.)

Pre nanočastice MG116 sú hodnoty rozdielu medzi PPLU a NPLU v nádorovej B16-F10 skupine nižšie, t.j. $110,88 \pm 21,26$ HU ($n=5$) ako tomu je v skupine zdravých jedincov, kedy je hodnota rozdielu medzi PPLU a NPLU $121,81 \pm 38,54$ HU ($n=3$). Ak porovnáme hodnoty rádiodenzity pre MG117 ukazuje sa, že MG117 taktiež vykazujú lepšie výsledky, t.j. vyššie hodnoty rozdielu medzi NPLU a PPLU v čase 24h p.i., v zdravých jedincoch $166,58 \pm 3,50$ HU ($n=3$), ako v tých nádorových $103,17 \pm 42,78$ HU ($n=5$).

Dôvod nižších hodnôt rádiodenzity v nádorových B16-F10 myšiach s aplikovanými MG117 č. 4 a 5 (viď príloha, tabuľka 3) sa nám nepodaril zistiť, avšak objem uzlín týchto B16-F10 nádorových jedincov č.4 ($3,84 \text{ mm}^3$) a 5 ($4,52 \text{ mm}^3$) (viď príloha, tabuľka 3) je porovnateľný s objemom uzlín zdravých jedincov č.1 ($3,31 \text{ mm}^3$) a č.3 ($4,62 \text{ mm}^3$) s MG117 (viď príloha, tabuľka 2). Pričom hodnoty rádiodenzity ich PPLU sú značne odlišné, a síce pre nádorovú myš č.4 je hodnota $20,08$ HU a pre nádorovú myš č.5 je hodnota $40,56$ HU (viď obe príloha, tabuľka 3) naproti hodnote rádiodenzity PPLU pre

zdravú myš č.1, ktorá je 163,88 HU a pre zdravú myš č.3 je 139,73 HU (viď obe príloha, tabuľka 2).

Prípadné metastatické napadnutie uzliny, ktoré mohlo spôsobiť jej čiastočnú nepriechodnosť u nádorových jedincov, a teda by vysvetľovalo už spomínané nízke hodnoty, však pitva vylúčila.

Na základe štatistickej analýzy konštatujeme, že manozylované nanočastice MG117 nemajú signifikantne lepšie kontrastné vlastnosti ($p < 0,5$) v nádorovom modeli v porovnaní s MG116, teda táto naša pôvodná hypotéza bola vyvrátená.

Celkové nižšie namerané hodnoty rádiodenzity v B16-F10 nádorových jedincoch však majú pravdepodobne súvis s patologickými zmenami lymfatických uzlín v odpovedi na prítomný tumor typu B16-F10, ako uvádza štúdia (Harrell *et al.*, 2007).

Podľa ich zistení, sa v prítomnosti tumoru B16-F10 zväčšuje nielen objem danej sentinelovej uzliny ale aj objem a rýchlosť pretekajúcej lymfy cez danú uzlinu sú zvýšené (Harrell, 2007). Taktiež podľa štúdie, ktorá sa zaoberala fyziologickými zmenami po implantácii B16-F10 tumoru do organizmu myši, sa v sentinelových uzlinách zvýšil počet makrofágov typu M1 signifikantne počas 10. až 16. dňa po implantácii tumoru, pričom súčasne značne klesol počet makrofágov typu M2 (Potez *et al.*, 2018). M2 makrofágy na svojom povrchu exprimujú práve manózový receptor typu CD206 (Tsuchiya *et al.*, 2019).

Domnievame sa teda, že nižšie hodnoty rádiodenzity môžu byť spôsobené najmä zvýšeným prietokom lymfy cez danú SLU a nakoľko sme aplikovali nanočastice na 11. deň od implantácie B16-F10 tumorových buniek, teda v čase, kedy hladina M2 makrofágov ešte neklesla, mohli sa nanočastice akumulovať v makrofágoch neukotvených v lymfatických uzlinách a prúdením lymfy sa dostať do iných častí tela.

Skúmané zlaté nanočastice disponovali predpokladanou schopnosťou priameho vizuálneho označenia danej pozitívnej popliteálnej lymfatickej uzliny (viď obr. 13, 14, 18 a 20), aby boli intraoperačne rozlíšiteľné.

Konštatujeme tiež, že zlaté nanočastice majú jednoznačne dlhšiu retenčnú dobu v lymfatickej uzline, keďže sme ich na CT snímkach detekovali aj 48h p.i, kdežto v prípade iopamidolu opísali Sugiyama *et al.* dobu možnej detekcie LU len do 5 minút po aplikácii (Sugiyama *et al.*, 2020).

V budúcnosti by sme videli niekoľko aspektov, ktoré by sa v ďalšom výskume mohli optimalizovať, ako napríklad rovnaký počet kusov zdravých jedincov ako nádorových jedincov, t.j. $n=5$. Taktiež by sme navrhovali vykonať opakovaný CT sken v testovacích skupinách v kratšom časovom úseku, najmä s ohľadom na nádorové skupiny, napríklad

6h, 12h a 24h aby sme dokázali určiť čas s maximálnou retenciou nanočastíc v LU a teda ideálnu dobu pre zobrazenie LU pre dosiahnutie najvyššieho možného kontrastu a taktiež rýchlosť ich pohybu z miesta aplikácie do cieľovej LU.

V súčasnej dobe sa v klinickej praxi úspešne aplikuje indocyanínová zelená (ICG) v pacientoch pri potrebnom vyšetrení lymfatického systému a biopsie sentinelovej uzliny s použitím fluorescenčného snímania v blízkej oblasti infračerveného svetla. Avšak jej slabá dlhodobá *in vitro* stabilita môže brániť ďalšiemu použitiu ICG v tejto oblasti (Wu a Butt, 2016). Okrem toho, je stále vysoká miera (46%) nesprávne určených lymfatických uzlín, respektíve ich vyhodnotenie ako negatívnych – nie sentinelových pri použití ICG v biopsii sentinelovej uzliny (Miyashiro *et al.*, 2014).

Nanočastice s konverziou v blízkej infračervenej oblasti (NIR) sú sľubné pre intraoperačné fluorescenčné SLU snímanie vďaka hĺbke prieniku svetla až 2 cm a vysokému pomeru signálu k šumu (Li *et al.*, 2015).

Doteraz sa výskum pre *in vivo* zobrazovacie metódy zamerá najmä na HPHT FND s veľkosťou približne 100 nm. Avšak relatívne nízka jasnosť a nízky pomer signálu k šumu stále nabádajú vedcov k vytvoreniu efektívnejších zobrazovacích prôb (Pietierjan a Hernot, 2019). Problém nedostatočného jasného nanoprôb zvyknú niektorí autori kompenzovať pripojením fluorescenčných farbív k FND (Vaijayanthimala *et al.*, 2012), čo však nie je prípad nami skúmaných FND.

Porovnanie ~ 100 a ~ 200 nm nanočastíc ukazuje, že obe nanočastice spadajú do rozsahu predstavujúceho najlepší kompromis medzi potrebou efektívnej a rýchlej lymfatickej drenáže a potrebou uspokojivej retencie v sentinelovej lymfatickej uzline. (tj. 100 až 200 nm) (Mariani *et al.*, 2001).

Nami skúmané HPHT FND sú vysoko koloidne stabilné s veľkosťou ~200nm, ktoré poskytujú veľmi jasnú dvojfarebnú emisiu v NIR a vo viditeľnej oblasti spektra.

Výsledky fluorescenčného snímania zdravých jedincov (n=5) jasne ukazujú akumuláciu ako nanočastíc KK69, tak i KK70 v pozitívnych popliteálnych lymfatických uzlinách 24h po ich subkutánnej aplikácii (viď grafy 12 - 15).

Ak porovnáme nami skúmané typy fluorescenčných nanodiamantov s konvenčnou metódou zobrazenia LU pomocou ICG, ktorú použili v štúdiu (Sugiyama *et al.*, 2020) konštatujeme, že retenčný čas je väčší a teda sú fluorescenčné nanodiamanty vhodnejšou voľbou pre zobrazovanie LU s ohľadom nielen na časové hľadisko ale aj na ich neimunogénnosť.

Priemerná intenzita fluorescence PPLU v zdravých myšiach pre KK69, konkrétne $5.1 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$ P/s/mm² a pre KK70, konkrétne $5.4 \times 10^7 \pm 9.4 \times 10^6$ P/s/mm² boli signifikantne vyššie ($p < 0.0005$) v porovnaní s príslušnými NPLU (viď všetky hodnoty v grafe 16). Tieto dáta nám potvrdzujú, že použité FND sa nielenže úspešne akumulovali v PPLU ale aj signifikantne zvýšili ich intenzitu fluorescence, teda sa preukázal ich potenciál ako kontrastných agens pre vizualizáciu LU bez ohľadu na skutočnosť, či disponovali povrchovou modifikáciou manózou alebo nie.

V nádorovom modeli, kde bola použitá bunková línia B16-F10 a počet jedincov pre každú skupinu bol $n=4$, mali PPLU taktiež vyššie hodnoty fluorescence NPLU, avšak hodnoty fluorescence boli nižšie pre oba typy diamantových nanočastíc v porovnaní a hodnotami v zdravom modeli. Konkrétne pre PPLU bola priemerná hodnota fluorescence vo vzorke myší s použitými KK69 $2,0 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^6$ P/s/mm² a vo vzorke s použitými KK70 bola priemerná hodnota fluorescence $2,7 \times 10^7 \pm 3,3 \times 10^6$ P/s/mm² (viď obe graf 19). Oba typy nanočastíc opäť disponovali signifikantne vyššou mierou fluorescence ($p < 0,005$) v PPLU v porovnaní s NPLU. Ak porovnáme dáta s vyššie uvedenými dátami zo zdravých myší, ukazuje sa, že pre vizualizáciu SLU má modifikácia kontrastných nanoprób manózou strategickú výhodu oproti nemodifikovanému typu.

Pre uvedené hodnoty s viac ako polovičným znížením intenzity fluorescence PPLU v B16-F10 nádorovom modeli oproti intenzite fluorescence PPLU v zdravom modeli sa naskytuje opäť možné vysvetlenie metastatického zasiahnutia danej sentinelovej lymfatickej uzliny, čo však bolo opäť vylúčené pitvou a následnou histologickou analýzou.

Na základe zistení o použitom nádorovom modeli, melanóme B16-F10, ktoré uviedli Potez *et al.*, v roku 2018, kde predmetom práce bol vplyv implantovaného tumoru B16-F10 v myšiach typu C57BL/6, dedukujeme, že nižšia miera fluorescence PPLU práve v nádorovom modeli je spojená so zvýšenou rýchlosťou prúdenia lymfy z tumoru do priľahlej sentinelovej lymfatickej uzliny, ako sme dedukovali pri zlatých nanočasticiach.

Ak porovnáme priemernú intenzitu fluorescence PPLU pre manozylované, KK70 s nemanozylovanými KK69 v B16-F10 modeli, zistíme, že KK70 mali štatisticky vyššiu mieru fluorescence v PPLU ($p < 0,05$) ako nanočastice, ktoré nedisponovali manózovou modifikáciou. Z údajov teda vyplýva, že modifikácia diamantových nanočastíc pomocou manózy signifikantne zlepšuje ich príjem a akumuláciu v LU a teda aj intenzitu fluorescence danej PPLU. Toto mohlo byť spôsobené rýchlejšim vyplavením nemanozylovaných KK69 z tumoru a následne aj zo SLU, pretože nedisponovali

modifikáciou, ktorá by im umožnila výhodu pre príjem makrofágmi a teda bola ich retencia v SLU v menšej miere.

V budúcom výskume by sme videli priestor pre optimalizáciu experimentu opäť v rovnakom počte testovacích kusov, t.j. napríklad $n=5$.

Na základe vyššie uvedených výsledkov vidíme manózou modifikované diamantové nanočastice ako sľubný nástroj pre selektívne fluorescenčné zobrazovanie SLU, s predpokladom perspektívy pre budúci výskum.

Manozylácia a jej efekt pre receptorom indukovaný príjem makrofágmi v SLU je už známy a dokázaný koncept, na základe ktorého už prebehla modifikácia tradične používaných agens pre vizualizáciu SLU. Táto modifikácia, napríklad v prípade produktu ^{99m}Tc -tilmanocept, ktorý už je schválený pre klinické použitie v USA, sa ukázala ako výhodná, pretože celkový retenčný čas v SLU sa zvýšil, ako uvádza Azad a Schlesinger (2015).

Preukázanie efektivity manozylácie v prípade fluorescenčných nanodiamantov a naopak jej vyvrátenie v prípade zlatých nanočastíc predstavuje podklad pre ďalší výskum. Domnievame sa, že dôvod by mohol byť v ich rozdielnej veľkosti a rozdielnej povrchovej úprave. Možno základná povrchová úprava zlatých nanočastíc a ich povrchový náboj stimuluje ich príjem makrofágmi, bez štatisticky významného rozdielu v prípade manozylácie, zatiaľ neznámym spôsobom. Hodnoty rádiodenzity pre zlaté nanočastice v zdravom modeli taktiež nemali až dvojnásobný prepad oproti ich hodnotám v B16-F10 modeli ako tomu bolo v prípade použitia FND, čo taktiež napovedá, že sú schopné retencie v LU aj v SLU v podobne efektívnej miere. Avšak opäť podotýkame, že je to len podnet pre budúci dôkladnejší výskum týkajúci sa podmienok a presného spôsobu makrofágového príjmu nanočastíc či už stimulovaného manozyláciou alebo na základe ich vlastností ako veľkosť, povrchová úprava a iné modifikácie.

6 ZÁVER

V tejto bakalárskej práci sme sa venovali novo vyvinutým typom nanočastíc pre selektívne zobrazovanie sentinelových lymfatických uzlín. V práci sme skúmali, hlavne otázku, či má modifikácia manózou štatisticky významný prínos pre selektívnu akumuláciu modifikovaných nanočastíc v LU. Naša hypotéza bola zameraná na fakt, že bunky makrofágov v LU majú na svojom povrchu receptor, ktorý rozpoznáva manózu (CD206) a teda by sa manozylované nanočastice, podľa našej hypotézy mali akumulovať rýchlejšie a vo vyššej miere v cieľovej LU.

V prvej časti, sme sa zamerali na zlaté nanočastice, ktoré sme detekovali *in vivo* v zdravých myšiach a v myšom nádorovom modeli, s implantovanou bunkovou líniou B16-F10, pomocou CT zobrazovania. Napriek tomu, že sa výsledky v zdravom modeli javili sľubne, z našich zistení vyplynulo, že modifikácia zlatých nanočastíc manózou, nemá štatisticky významnú výhodu, oproti rovnakým nanočasticiam, avšak bez manózy. Výsledky z nádorového modelu toto zistenie potvrdili. Hypotézu sa nám teda pre zlaté nanočastice nepodarilo potvrdiť. LU však boli vo všetkých prípadoch úspešne selektívne zobrazené a ich viditeľnosť na CT snímkach bola signifikantne lepšia v porovnaní s LU, ktoré neobsahovali žiadne zlaté nanočastice. Podarilo sa nám teda dokázať, že častice s priemerom 165 nm sú tiež schopné vizualizovať LU.

V druhej časti bakalárskej práce, sme sa zamerali na výskum 200 nm veľkých HPHT diamantových nanočastíc, kde taktiež boli dva podtypy skúmaných nanočastíc, pričom jeden podtyp – KK70 bol opäť odlišný svojou modifikáciou pomocou manózy od častíc KK69 (bez manózy). Výskum opäť prebiehal na *in vivo* a *ex vivo* myšom modeli s implantovanou bunkovou líniou B16 – F10. Pre tento podtyp nanočastíc sa nám podarilo potvrdiť našu hypotézu, i keď miera fluorescencie lymfatických uzlín v nádorovom modeli bola nižšia ako v zdravej kontrole. Všetky LU sa však podarilo úspešne zobraziť za pomoci ich fluorescencie a oba typy nanočastíc KK69 aj KK70 vykazovali signifikantné zlepšenie kontrastu LU oproti ich negatívnym kontrolám.

Podľa uvedených výsledkov konštatujeme, že KK70 sa javia ako sľubný podtyp diamantových nanočastíc pre selektívne zobrazovanie SLU.

Celkovo sa nám v oboch experimentoch podarilo úspešne vizualizovať dané lymfatické uzliny 24h od aplikácie daných nanočastíc, teda v porovnaní s konvenčnými metódami je jasne vidieť progres v retenčnom čase nanočastíc v danej lymfatickej uzline, takže konštatujeme, že obe metódy sú perspektívne pre ďalšie dodatočné výskumy.

7 LITERATÚRA

- Ahmed M., Purushotham A., Douek M., (2014): Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology* **15**, 351–362.
- Alazraki N., Podoloff D., Glass E., Castronovo F., Valdés Olmos R., (2002): Procedure Guideline for Lymphoscintigraphy and the Use of Intraoperative Gamma Probe for Sentinel Lymph Node Localization in Melanoma of Intermediate Thickness 1.0*. *The Journal Of Nuclear Medicine* **43**, 1414-1418.
- Albertini J., Lyman G.H., Cox C., Balducci L. a Yeatman T., (1996): Lymphatic Mapping and Sentinel Node Biopsy in the Patient With Breast Cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **276**, 1818–1822.
- Alex, J.C. a Krag D.N., (1993): Gamma-probe guided localization of lymph nodes. *Surgical Oncology* **2**, 137-143.
- Azad A. K. a Schlesinger L. S., (2015): Mannose receptor (CD206)-mediated imaging in sentinel lymph node localization. *Clinical and Translational Imaging* **3**, 237-245.
- Barto, D.P.J., Berman C., Cavanagh D., Roberts W.S., Hoffman M.S., Fiorica J.V., M.A. Finan, (1992): Lymphoscintigraphy in vulvar cancer: A pilot study. *Gynecologic Oncology* **46**, 341-344.
- Bujoreanu I., Gupta V., 2020. *Anatomy: Lymph Nodes* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2021-01-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557717/>
- Cabanas R.M., (1977): An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. **39**, 456-66.
- Cai X., Li W., Kim Ch., Yuan Y., Wang L., Xia Y. (2011). In Vivo Quantitative Evaluation of the Transport Kinetics of Gold Nanocages in a Lymphatic System by Noninvasive Photoacoustic Tomography. *ACS Nano* **5**, 9658-9667.
- Carlsson C. A, (1999). Imaging modalities in x-ray computerized tomography and in selected volume tomography. *Physics in Medicine and Biology* **44**, 23-56.
- Claveau S., Bertrand J.R., Treussart F. (2018): Fluorescent Nanodiamond Applications for Cellular Process Sensing and Cell Tracking. *Micromachines* **9**, 1-13
- Cong L., Takeda M., Y. Hamanaka, Gonda K., Watanabe M., Kumasaka M., Kobayashi, Masaki Kobayashi Y., Ohuchi N. (2010): Uniform Silica Coated Fluorescent Nanoparticles: Synthetic Method, Improved Light Stability and Application to Visualize Lymph Network Tracer. *PLoS ONE* [online] **5**, 1-6. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0013167
- Cousins A., Thompson S., Wedding A., Thierry B., (2014): Clinical relevance of novel imaging technologies for sentinel lymph node identification and staging. *Biotechnology Advances* **32**, 269-279.
- Cserni, G., 1999. Metastases in axillary sentinel lymph nodes in breast cancer as detected by intensive histopathological work up. *Journal of Clinical Pathology* **52**, 922-924.
- Čihák, Radomír, 2004. *Anatomie 3. 2*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1132-X.
- Elmore S. A., (2016): Histopathology of the Lymph Nodes. *Toxicologic Pathology* **34**, 425-454.
- Gould, Ernest A., (1960): Observations On A “Sentinel Node” In Cancer Of The Parotid. *Cancer* **13**, 77-78.
- Govaert G.A.M., Oostenbroek R.J., Plaisier P.W., (2005): Prolonged skin staining after intradermal use of patent blue in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **31**, 373-375.
- Gratton, S., Ropp P., Pohlhaus P., Luft J., Madden V., Napier M., Desimone J., (2008): The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 11613-11618.
- Grimm J. a David Scheinberg, (2011): Will Nanotechnology Influence Targeted Cancer Therapy?. *Seminars in Radiation Oncology* **21**, 80-87.
- Hameed S., Chen H., Irfan M., Bajwa S., Khan W., Baig S., Dai Z., (2018): Fluorescence Guided Sentinel Lymph Node Mapping: From Current Molecular Probes to Future Multimodal Nanoprobes. *Bioconjugate Chemistry* **30**, 13-28.
- Harrell M. I., Iritani B. M., Ruddell A. (2007): Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis. *The American Journal of Pathology* **170**, 774-786.

- Hayashi H., Ochiai T., Mori M., Karube T., Suzuki T., Gunji Y., Hori S., Akutsu N., Matsubara H., Shimada H. (2003): Sentinel Lymph Node Mapping for Gastric Cancer Using a Dual Procedure with Dye- and Gamma Probe-Guided Techniques. *Journal of the American College of Surgeons* **196**, 68-74
- Hiraiwa K., Ueda M., Takeuchi H., Oyama T., Irino T., Yoshikawa T., Kondo A., Kitagawa Y. (2012): Sentinel Node Mapping with Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles in Rats. *Journal of Surgical Research*. **174**, 48-55.
- Chen S. a Bilchik A., 2006. More Extensive Nodal Dissection Improves Survival for Stages I to III of Colon Cancer. *Transactions of the ... Meeting of the American Surgical Association* **124**, 267-275.
- Chu M. a Wu M., 2012. Self-illuminating quantum dots for highly sensitive in vivo real-time luminescent mapping of sentinel lymph nodes. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 3433-43.
- Johnson O., Johnson O.W., Chick J.F., Chauhan N.R., Fairchild A.H., Fan C.M., Stecker M.S., Killoran T.P., Suzuki-Han A. (2016): The thoracic duct: clinical importance, anatomic variation, imaging, and embolization. *European Radiology*. **8**, 2482-93. _
- Johnston H.J., Hutchison G.R., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Aschberger K., Stone V. A., (2009): A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics. *Nanotoxicology*. **4**, 207-246.
- Joseph F.J., van Oepen A., Friebe M. (2017): Breast sentinel lymph node biopsy with imaging towards minimally invasive surgery. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*. **62**, 547-555.
- Kala Z., Kysela P., Ostřížková L., Kiss I., Válek V., Andrašina T., (2011): Chirurgická a miniinvazivní léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologie* **5**, 270-273.
- Kholová, Ivana, 2010. Lymfatický systém: novinky v morfológii a patologii. *Česko-slovenská patologie*. **46**, 98-103.
- Kim S.W., Zimmer J.P., Ohnishi S., Tracy J.B., Frangioni J.V., Bawendi M.G. (2005): Engineering InAs x P 1- x /InP/ZnSe III-V Alloyed Core/Shell Quantum Dots for the Near-Infrared. *Journal of the American Chemical Society*. **127**, 10526-10532.
- Kolhar P., Anselmo A.C., Gupta V., Pant K., Prabhakarandian B., Ruoslahti E., Mitragotri S. (2013): Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**, 10753-10758.
- Koranda, Pavel, 2014. *Nukleární medicína*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 201 s. Skripta. ISBN 978-80-244-4031-6.
- Krag D.N., Weaver D.L., Alex J.C., Fairbank J.T., (1993): Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surgical Oncology* **2**, 335-340.
- Kubikova E., Badidova J., Klein M., Benus R., Polak S., Varga I. (2019): Sentinel lymph node – historical background and current views on its significance in complex management of breast cancer patients. *Bratislava Medical Journal*. **120**, 410-416.
- Lammers T., a Ulbrich K. (2010): HEMA copolymers: 30years of advances☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **62**, 119-121.
- Leung M., McCusker C., Ben-Shoshan M. (2019): Anaphylaxis to patent blue dye in a 17-year-old boy. *BMJ Case Reports* **12**, Dostupné z: doi:10.1136/bcr-2018-226191
- Liao S. a Von Der Weid P.Y., (2015). Lymphatic system: An active pathway for immune protection. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. (38), 83-89 [cit. 2021-01-15]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.0121084-9521>.
- Li J., Zhuang Z., Jiang B., Zhao P., Lin C. (2015): Advances and perspectives in nanoprobes for noninvasive lymph node mapping. *Nanomedicine* **10**, 1019-1036.
- L Lim S.J., Lim J.S., Choi J., Choi J.Y., Hyung W.J., Kim H.S., Suh J., Kim K.W. (2010): Nanoscaled Iodized Oil Emulsion as a CT Contrast Agent for the Detection of Experimental Liver Tumors in a Rat Model. *Academic Radiology* **17**, 985-991.
- Luciani A., Itti E., Rahmouni A., Meignan M., Clement O. (2006): Lymph node imaging: Basic principles. *European Journal of Radiology* **58**, 338-344.

- Luke G., Bashyam A., Homan K., Makhija S., Chen Y.S., Emelianov S., (2013): Silica-coated gold nanoplates as stable photoacoustic contrast agents for sentinel lymph node imaging. *Nanotechnology* **24**, 1-8. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/24/45/455101
- Madru R., Axelsson J., Ingvar Ch., Bibic A., Ståhlberg F., Knutsson L., Strand S.E. (2014): 68Ga-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for multi-modality PET/MR/Cherenkov luminescence imaging of sentinel lymph nodes. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **4**, 60-69.
- Mariani G., Moresco L., Viale G. (2001): Radioguided sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery. *The Journal Of Nuclear Medicine*. **42**, 1198-1215.
- Masannat Y.A., Shenoy H., Speirs V., Hanby A., Horgan K. (2006): Properties and characteristics of the dyes injected to assist axillary sentinel node localization in breast surgery. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **32**, 381-384.
- Masannat Y.A., Hanby A., Horgan K., Hardie L.J. (2009): DNA Damaging Effects of the Dyes Used in Sentinel Node Biopsy: Possible Implications for Clinical Practice. *Journal of Surgical Research* **154**, 234-238.
- Minato M., Hirose C., Sasa M., Nishitani H., Hirose Y., Morimoto T. (2004): 3-Dimensional Computed Tomography Lymphography–Guided Identification of Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients Using Subcutaneous Injection of Nonionic Contrast Medium. *Journal of Computer Assisted Tomography* **28**, 46-51.
- Miyashiro I., Hiratsuka M., Sasako M., Sano T., Mizusawa J., Nakamura K., Nashimoto A., Tsuburaya A., Fukushima N. (2014): High false-negative proportion of intraoperative histological examination as a serious problem for clinical application of sentinel node biopsy for early gastric cancer: final results of the Japan Clinical Oncology Group multicenter trial JCOG0302. *Gastric Cancer* **17**, 316-323.
- Mokhtar M., Tadokoro Y., Nakagawa M., Morimoto M., Takechi H., Kondo K., Tangoku A. (2016): Triple assessment of sentinel lymph node metastasis in early breast cancer using preoperative CTLG, intraoperative fluorescence navigation and OSNA. *Breast Cancer* **23**, 202-210.
- Morton D. L. (1992): Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma. *Archives of Surgery* **127**
- Morton D.L., Thompson J.F., Cochran A.J., Mozzillo N., Elashoff R., Essner R., Nieweg O.E., Roses D.F., Hoekstra H.J., Karakousis C.P., Reintgen D.S., Coventry B.J., Glass E.C., Wang H.J. (2006): Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *New England Journal of Medicine* **355**, 1307-1317.
- Narayanan R. a Wilson T. (2018): *Sentinel node evaluation in prostate cancer* **35**, 471-485.
- Neoral Č. a Bohanes T., 2012. *Biopsie sentinelové uzliny 1*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-882-7.
- Ni X., Jia S., Duan X., Ding D., Li K. (2018): Fluorescent Nanoparticles for Noninvasive Stem Cell Tracking in Regenerative Medicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **14**, 240-256.
- NNoguchi, M., Motomura, K., Imoto, S., Miyauchi, M., Sato, K., Iwata, H., ... Tsugawa, K. (2000): A multicenter validation study of sentinel lymph node biopsy by the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer Research and Treatment* **63**, 31-40.
- Ogasawara, Y., Ikeda, H., Takahashi, M., Kawasaki, K., Doihara, H. (2008): Evaluation of Breast Lymphatic Pathways with Indocyanine Green Fluorescence Imaging in Patients with Breast Cancer. *World Journal of Surgery* **32**, 1924-1929.
- Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W. (2007): Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **3**, 1941-1949.
- Peng Ch.W. a Li Y. (2010): Application of Quantum Dots-Based Biotechnology in Cancer Diagnosis: Current Status and Future Perspectives. *Journal of Nanomaterials* **2010**, 1-11.
- Pietierjan D. a Hernot S., (2019): Emerging Fluorescent Molecular Tracers to Guide Intra-Operative Surgical Decision-Making. *Frontiers in Pharmacology* **2019** Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2019.00510
- Polena S., Yang S., Alam R., Gricius J., Gupta J.R., Badalova N., Chuang P., Gintautas J., Conetta R. (2005): Nephropathy in critically ill patients without preexisting renal disease. *Proc West Pharmacol Soc.* **48**, 134-5.

- Potez M., Trappetti V., Bouchet A., Fernandez-Palomo C., Güç E., Kilariski W.W., Hlushchuk R., Laissue J., Djonov V. (2018): Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. *PLOS ONE*. **13**, e0206693 doi: 10.1371/journal.pone.0206693..
- Pratt E.C., Shaffer T.M., Grimm J. (2016): Nanoparticles and radiotracers: advances toward radionanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **8**, 872-890.
- Ravizzini G., Turkbey B., Barrett T., Kobayashi H., Choyke P., (2009): Nanoparticles in sentinel lymph node mapping. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **1**, 610-623.
- Sakorafas G.H. a Peros G. (2007). Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: what a physician should know, a decade after its introduction in clinical practice. *European Journal of Cancer Care* **16**, 318-321.
- Sarikaya I., Sarikaya A., Reba R.C. (2008): Gamma probes and their use in tumor detection in colorectal cancer. *International Seminars in Surgical Oncology* **5**, 5-25
- Servais E.L., Colovos C., Bograd A.J., White J., Sadelain M., Adusumilli P.S. (2011): Animal models and molecular imaging tools to investigate lymph node metastases. *Journal of Molecular Medicine* **89**, 753-769.
- Shields J.D., 2011. Lymphatics: At the Interface of Immunity, Tolerance, and Tumor Metastasis. *Microcirculation* **18**, 517-531.
- Schöder H., Glass E.C., Pecking A.P., Harness J.K., Wallace A.M., Hirnle P., Alberini J.L., Vilain D., Larson S.M., Hoh C.K., Vera D.R. (2006): Molecular targeting of the lymphovascular system for imaging and therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* **25**, 185-201.
- Schrand A.M., Huang H., Carlson C., Schlager J.J., Omacr Sawa E., Hussain S.M., Dai L. (2007): Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?. *The Journal of Physical Chemistry B*. **111**, 2-7.
- Schroeder A., Heller D.A., Winslow M.M., Dahlman J.E., Pratt G.W., Langer R., Jacks T., Anderson D.G. (2012): Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer* **12**, 39-50.
- Sobin, L.H, M.K Gospodarowicz, Ch. Wittekind, 2011. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. 7. Praha: Úrad zdravotníckých informací a statistiky České republiky. ISBN 978-80-904259-6-5.
- Song K.H., Kim C., Cogley C.M., Xia Y., Wang L.V. (2009): Near-Infrared Gold Nanocages as a New Class of Tracers for Photoacoustic Sentinel Lymph Node Mapping on a Rat Model. *Nano Letters* **9**, 183-188.
- Sperling R.A., Rivera Gil P., Zhang F., Zanella M., Parak W.J. (2008): Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews* [online]. **9**, 1896–1908 [cit. 2021-01-06]. Dostupné z: doi:10.1039/b712170a
- Staník M., Macík D., Čapák I., Marečková N., Lžičařová E., Doležel J. (2018): Sentinel lymph node dissection in prostate cancer using superparamagnetic particles of iron oxide: early clinical experience. *International Urology and Nephrology* **50**, 1427-1433.
- Sudhakar S. a Santhosh P.B., 2017. Gold Nanomaterials. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly* **25**, 161-180.
- Sugiyama S., Iwai T., Izumi T., Baba J., Oguri S., Hirota M., Mitsudo K. (2020): Sentinel lymph node mapping of clinically N0 early oral cancer: a diagnostic pitfall on CT lymphography. *Oral Radiology* [online]. 1-5. Dostupné z: doi:10.1007/s11282-020-00442-1
- Šimša, Jaromír, 2010. *Sentinelová uzlina lymfadenektomie u solidních nádorů*. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-213-1.
- Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S. (2005): Macrophage Receptors And Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* **23**, 901-944.
- Thill M., Kurylcio A., Welter R., van Haasteren V., Grosse B., Berclaz G., Polkowski W., Hauser N. (2014): The Central-European SentiMag study: Sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. *The Breast*. **23**, 175-179.
- Tsuchiya K., Suzuki Y., Yoshimura K., Yasui H., Karayama M., Hozumi H., Furuhashi K., Enomoto N., Fujisawa T., Nakamura Y., Inui N., Yokomura K., Suda T. (2019): Macrophage

- Mannose Receptor CD206 Predicts Prognosis in Community-acquired Pneumonia. *Scientific Reports* [online]. **9**, 1-10. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-55289-2
- Urbánek J., Knotková V., Bíbrová J. a Dvůrák P., 2000. *Nukleární Medicína*. 3. Praha: Gentiana Jilemnice. ISBN 80-902133-9-1.
- Uthaman S., Kim H.S., Revuri V., Min J.J., Lee Y.K., Huh K.M., Park I.K. (2018): Green synthesis of bioactive polysaccharide-capped gold nanoparticles for lymph node CT imaging. *Carbohydrate Polymers* **181**, 27-33.
- Vaijayanthimala V., Cheng P.Y., Yeh S.H., Liu K.K., Hsiao C.H., Chao J.I., Chang H.C. (2012): The long-term stability and biocompatibility of fluorescent nanodiamond as an in vivo contrast agent. *Biomaterials* **33**, 7794-7802.
- Wang YX., 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* **1** 35-40.
- Weinberg R. A. (2014). *The biology of cancer* 2nd ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4219-9.
- Wolfram J., Zhu M., Yang Y., Shen J., Gentile E., Paolino D., Fresta M., Nie G., Chen C., Shen H., Ferrari M., Zhao Y. (2015): Safety of Nanoparticles in Medicine. *Current Drug Targets* **16**, 1671-1681.
- Wu S. a Butt HJ. (2016): Near-Infrared-Sensitive Materials Based on Upconverting Nanoparticles. *Advanced Materials* **28**, 1208-1226.
- Xi, D., Dong, S., Meng, X., Lu, Q., Meng, L., & Ye, J. (2012): Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents. *RSC Advances* **2**, 12515-12524.
- Zhao H., Huang, T., Li H. (2019): Risk factors for skip metastasis and lateral lymph node metastasis of papillary thyroid cancer. *Surgery* **166**, 55-60.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

^{99m}Tc HSA	metastabilný jadrový izomér technécia-99 s naviazaným ľudským sérovým albumínom
^{99m}Tc	metastabilný jadrový izomér technécia-99
AgNP	strieborné nanočastice
ATCC	americká kolekcia tkanivových kultúr
AuNP	zlaté nanočastice
AuNShs	zlaté nanoshells
BALB/c	kmeň laboratórných myší
BSA	teľací sérový albumín
C57BL/6	kmeň laboratórných myší
CLI	Cherenkovo luminiscenčné zobrazovanie
CT	počítačová tomografia
DC	dendritické bunky
DMEM	Dulbecovo modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimetylsulfoxid
FBS	fetálne bovinné sérum
FCSi	tepelne inaktivované fetálne bovinné sérum
FDG	^{18}F -fluór-2-deoxy-D glukóza
FND	fluorescenčné nanodiamanty
HPHT FND	fluorescenčné nanodiamanty vyrobené pod vysokým tlakom za vysokej teploty
HSA	ľudský sérový albumín
ICG	indocyanínová zelená
IONP	nanočastice oxidu železa
kD	kilodalton
KK69	nemanozylované fluorescenčné nanodiamanty
KK70	manozylované fluorescenčné nanodiamanty
LU	Lymfatická uzliny
MB	metylénová modrá
MG116	nemanozylované zlaté nanočastice
MG117	manozylované zlaté nanočastice
MR, CD 206	manózový receptor CD206

MRI	magnetická rezonancia
MTT test	cytotoxický test
NIR	blízka oblasť infračerveného žiarenia
NP	nanočastica
PAI	fotoakustické zobrazovanie
PBV	patentná modrá V
PET	pozitronová emisná tomografia
QDs	kvantové bodky
ROI	oblasť záujmu
ROS	reaktívne formy kyslíka
Si-AuNPs	zlaté nanočastice s povrchovou vrstvou kremíku
SLN	sentinel lymph node
SLU	sentinelová lymfatická uzlina
SPF	bez špecifických druhov patogénov
SPIO	superparamagnetické častice oxidu železitého
TNM klasifikácia	klasifikácia prítomnosti nádorových metastáz v lymfatických uzlinách
trypLE	trypsín
VOI	objem záujmu

9 PRÍLOHY

Tabuľka 1 Softwarová kvantifikácia CT snímok lymfatických uzlín nádorových myši s aplikovanými MG116 vyhotovených 24h p.i.

MG116				
B16-F10 nádorové myši	Rádiodenzita (HU)		Objem (mm ³)	
	PPLU	NPLU	PPLU	NPLU
Myš č.1	74,57	-31,49	4,91	1,32
Myš č.2	38,48	-48,44	3,74	1,12
Myš č.3	60,94	-50,56	7,16	1,31
Myš č.4	63,83	-40,97	3,94	1,66
Myš č.5	86,95	-58,17	4,72	0,92

Tabuľka 2 Softwarová kvantifikácia CT snímok lymfatických uzlín zdravých myši s aplikovanými MG117 vyhotovených 24h p.i.

MG117				
zdravé myši	Rádiodenzita (HU)		Objem (mm ³)	
	PPLU	NPLU	PPLU	NPLU
Myš č.1	163,88	-5,49	3,30	1,86
Myš č.2	132,61	-30,04	2,68	1,74
Myš č.3	139,73	-27,99	4,61	1,16

Tabuľka 3 Softwarová kvantifikácia CT snímok lymfatických uzlín nádorových myši s aplikovanými MG117 vyhotovených 24h p.i.

MG117				
B16-F10 nádorové myši	Rádiodenzita (HU)		Objem (mm ³)	
	PPLU	NPLU	PPLU	NPLU
Myš č.1	78,52	-35,34	6,35	0,88
Myš č.2	82,42	-22,45	5,54	1,28
Myš č.3	126,22	-41,23	5,02	3,13
Myš č.4	20,08	-36,63	3,84	1,19
Myš č.5	40,56	-32,39	4,52	0,93