

NOVÉ MOŽNOSTI PRO VÝZKUM TERANOSTIK U CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODY

Publikace je věnována 100. výročí založení Katedry analytické chemie PŘF UK Praha.

MICHAELA KUCHYNKA^{a,b,c}, JAN BISKUPIČ^a, MAGDALENA ONUŠČÁKOVÁ^a, PETER SCHEER^c,
JANA HLOŽKOVÁ^c a VIKTOR KANICKÝ^b

^a Ústav chemických léčiv, Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno, ^b Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^c Ústav farmakologie a toxikologie, Masarykova univerzita, Palackého třída 1946/1, 612 00 Brno, Česká republika
viktork@chemi.muni.cz

Došlo 16.9.24, přijato 15.10.24.

Cévní mozková příhoda, infarkt myokardu a plicní embolie představují významnou zdravotní zátěž pro současnou společnost, přičemž jejich hlavní příčinou jsou krevní sraženiny a poškození vnitřní výstelky cév (endotelu). Přesná a rychlá diagnostika těchto sraženin, zejména určení jejich stáří, je klíčová pro optimální volbu léčebného postupu, jako je trombolýza (farmakologické rozpuštění sraženiny) nebo trombektomie (mechanické odstranění sraženiny). Stávající diagnostické metody však nedosahují požadované úrovně přesnosti a efektivity.

Tento článek zkoumá potenciál jodovaných nanočástic (IoNP) na bázi polyjodovaných biodegradabilních polymerů, které mohou cíleně vyhledávat specifické složky, jako je fibrin, a umožnit tak vizualizaci krevních sraženin pomocí rentgenových zobrazovacích metod, jako je počítačová tomografie (CT) nebo skiaskopie. Nanočástice mají schopnost nejen zobrazit sraženiny, ale také odhadnout jejich stáří, což by mohlo výrazně podpořit moderní teranostický přístup, který kombinuje diagnostiku a terapii.

Článek také demonstruje možnosti testování farmakokinetiky těchto teranostik pomocí modelového organismu (potkana), využívající metodu laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Tento přístup přispívá k lepšímu porozumění biodegradability potenciálních léčiv a představuje klíčový krok v preklinickém hodnocení.

Klíčová slova: cévní mozková příhoda, teranostika, laserová ablace, nanočástice

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění, zejména ischemická choroba srdeční a cerebrovaskulární neboli cévní mozkové příhody (CVP), jsou hlavními příčinami úmrtí ve vyspělých zemích. Dle údajů WHO byly v roce 2020 zodpovědné za více než 50 % úmrtí¹. Nejčastějším typem CVP je ischemická cévní mozková příhoda (CMP), která představuje přibližně 80 % všech příhod. U přeživších mohou komplikace spojené s cévní mozkovou příhodou přetrvávat po dlouhou dobu. Dokonce i po 15 letech žijí dvě třetiny pacientů s postižením, téměř dva z pěti trpí depresí a více než čtvrtina kognitivními poruchami. Kromě toho se u pacientů s cévní mozkovou příhodou mnohem častěji objevují další onemocnění a zdravotní komplikace². Z tohoto důvodu je nezbytné brát v úvahu také ekonomickou zátěž s ní spojenou. V Evropské unii (EU) činily celkové náklady na cévní mozkovou příhodu v roce 2015 45 miliard euro a v roce 2017 se zvýšily na 60 miliard euro (cit.³). Pouze 45 % této částky bylo vynaloženo na přímé

náklady na zdravotní péči. Zbývající rozpočtová položka byla určena na nepřímé náklady spojené s dlouhodobou léčbou, rehabilitací a ztrátou produktivity. V přepočtu činí roční náklady na léčbu každého pacienta s cévní mozkovou příhodou 3 483 euro, tj. 59 euro na občana EU. Statistické prognózy ukazují, že počet případů tohoto onemocnění v EU se do roku 2035 zvýší až o 36 %. Kromě toho je třeba věnovat pozornost také cévním mozkovým příhodám spojeným s pandemií koronaviru SARS-CoV-2. Ten se prokázal jako vysoce protrombotický (podporuje vznik sraženin) a může způsobit mikrovaskulární (malé krevní cévy – arterioly, kapiláry a venuly) a makrovaskulární (velké krevní cévy – tepny a žíly) trombózu (stav, při kterém dochází k tvorbě krevní sraženiny uvnitř cévy) v různých orgánech. Během pandemie koronaviru mnoho obyvatel váhalo s vyhledáním lékařské pomoci, což vedlo ke snížení počtu hospitalizací u méně závažných příhod a zvýšení hospitalizace u závažnějších případů a k zvýšení úmrtnosti. Jejím vlivem na společnost a systémy zdravotní péče je tedy potřeba se zabývat, aby bylo možné zlepšit

léčebné postupy cévních mozkových příhod a připravit se na možné budoucí epidemie⁴.

Vzhledem k významnému společenskému a ekonomickému dopadu je nejdůležitější otázkou zlepšení dlouhodobé prognózy přeživších a jejich návrat do normálního a produktivního života. Klíčem k úspěchu je čas (co nejkratší). Včasnost diagnostiky a léčby je prvořadá, přesto je odhalení počátku cévní mozkové příhody stále náročné, zejména v případech, kdy se příznaky projeví během spánku, tedy přesný čas počátku cévní mozkové příhody není znám (WUS, z angl. wake up stroke). Tito pacienti tvoří 20–25 % případů tohoto onemocnění a jsou často vyloučeni z konvenční léčby, což vede k horším výsledkům. V současné době se cévní mozková příhoda úspěšně diagnostikuje, nejčastěji s využitím počítačové tomografie (CT) nebo zobrazovací magnetické rezonance (MRI). Posouzení stáří cévní mozkové příhody však není možné, ačkoliv je pro další personalizovanou léčbu nesmírně důležité. Přizpůsobení léčby každému pacientovi vede k vyšší úspěšnosti při záchraně života, zmírnění případné invalidity a nepřímo i ke snížení ekonomické zátěže společnosti.

Strategie léčby mrtvice

U pacientů s akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou existují tři možnosti léčby. První možností je farmakologická léčba, kdy se přistupuje k aplikaci trombolytika (léčivo používané k rozpouštění krevních sraženin působící tak, že aktivuje enzymy, které štěpí fibrin – hlavní složku krevní sraženiny), čímž obnovuje průtok krve. V České republice je schválena pouze altepláza (rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu, t-PA) pro rozpuštění sraženiny vzniklé v krevním řečišti při mozkové příhodě. Další možností je trombektomie, tedy odstranění této sraženiny mechanicky pomocí katetrů, třetí případ je kombinace trombolýzy a trombektomie. Cílem všech těchto postupů je rekanalizace cévy, tedy obnovení její průchodnosti poté, co byla uzavřena⁵. Co nejrychlejší zahájení léčby pacientů je zásadní, protože „čas je mozek“. Každá hodina prodlení zhoršuje prognózu plného uzdravení o 15 %. Jak trombolýza, tak mechanická trombektomie mají svoje výhody i svá rizika. Hlavní výhodou trombolytického přístupu je nízká cena, nenáročnost na vybavení a velmi rychlé podání léčiva. Základním předpokladem pro použití intravenózní alteplázy je doba její aplikace. Nevýhodou je úzké terapeutické okno, lze ji použít pouze do 4,5 hodiny od jasně definovaného počátku příznaků. Další nevýhodou je nízká účinnost u velkých trombů a zvýšené riziko jak systémového, tak intrakraniálního krvácení. Výhodou mechanické trombektomie je naopak delší terapeutické okno (do 6 hodin, v indikovaných případech i více) a možnost vyřešit i okluzi velkými tromby. Nevýhoda spočívá v závislosti výsledků léčby na zkušenostech neuroradiologa, je mnohem finančně náročnější a její zahájení je vzhledem k nutným přípravám pozdější. Nebezpečím může být rozdělení sraženiny na více částí, které se mohou uvolnit dále do krevního řečiště.

Nejkritičtější podmínkou je identifikace penumbry, tj. již neprokrvované oblasti mozku ale stále ještě potenciálně zachránitelné, nikoli již mrtvé mozkové tkáně. Bohužel v mnoha zemích stále ještě neexistuje dobrá síť specializovaných center pro léčbu cévních mozkových příhod s nepřetržitou péčí⁶.

Zobrazování sraženin *in situ*

Informace o velikosti, složení a původu sraženiny mají potenciál poskytnout zásadní podklady pro volbu léčebné strategie nejen u samotné cévní mozkové příhody, ale mohou pomoci i při diagnostice a léčbě dalších závažných kardiiovaskulárních onemocnění, jako jsou arteriální embolizace, infarkt myokardu nebo ledvin, plicní embolie a hluboká žilní trombóza⁷. Dnešní zobrazovací metody (např. CT, rentgen, ECHO – echokardiografie, tedy ultrazvuk k vyšetření srdce) umožňují spolehlivou vizualizaci sraženin. Ty se skládají především z trombocytů, červených a bílých krvinek a fibrinových vláken. Podle množství těchto složek existují tři typy sraženin (a) bílé sraženiny (vysoké množství fibrinu), (b) červené sraženiny (bohaté na červené krvinky) a (c) smíšené. Moderní zobrazovací metody detegují umístění sraženiny s velkou přesností, ale zobrazení sraženiny je reálné pouze v případě, že se jedná o červené sraženiny. Ty se velice dobře rozpouštějí a nejsou tak léčebnou výzvou. Hlavním problémem zůstává určení velikosti a charakteru sraženiny. Bílé sraženiny mají vysoký podíl fibrinu, jsou rezistentní k trombolýze, a proto je jejich vizualizace klíčová pro volbu správné léčebné strategie.

Teranostika

Teranostika je poměrně nová oblast medicíny a v současné době se jeví jako velmi vhodný nástroj personalizované medicíny, která je v mnoha případech při nastavení správné a účinné léčby nezbytná. Termínem teranostika označujeme spojení terapeutických a diagnostických přístupů do jednoho celku. Vytvoří se tak proces, který je současně diagnostikou, monitorováním a léčbou onemocnění za použití jednoho nástroje, látky nebo metody. Základním konceptem teranostiky je současně fungování diagnostického a léčebného prvku při jediné aplikaci. Cílem teranostiky bylo vytvořit pro různé patologické projevy specifickou a selektivní léčbu a tím dosáhnout zefektivnění terapie, přizpůsobení terapie na základě monitorování léčby a následně snížení pravděpodobnosti výskytu nežádoucích účinků⁸.

Odborný výraz teranostika byl poprvé použit v roce 1998 Johnem Funkhouserem⁹ a již léta se přístup teranostiky uplatňuje v nukleární medicíně, kde je úspěšně používána a má svůj nezastupitelný význam při léčbě např. nádorových onemocnění štítné žlázy. Postupně se teranostika dostává i do dalších oblastí medicíny vzhledem k postupnému rozvoji nanotechnologií. U nanočástic (NP) je předpoklad, že díky svým dobře modifikovatelným biolo-

gickým vlastnostem by mohly mít bohaté spektrum využití hlavně při rozvoji personalizované medicíny a teranostiky.

V nukleární medicíně je jako teranostikum vnímán specifický radioaktivní izotop, který je vázán na léčivou látku. Ta má pak selektivní afinitu k určitému typu tkáně, tj. váže se na receptory buněk¹⁰. V posledních letech se teranostika úspěšně aplikuje u celé řady nádorových onemocnění, jako je rakovina prostaty a neuroendokrinní nádory. Jedním z již registrovaných a v terapeutické praxi používaných teranostik je radioterapeutický konjugát zvaný ¹⁷⁷Lu-PSMA-617, který je určen k léčbě pokročilé rezistentní formy rakoviny prostaty. Tento preparát americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration) schválil začátkem roku 2022 pod obchodním názvem Pluvicto® (cit.¹¹). Léčivo ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 je kombinací radioaktivního izotopu lutecia-177 (¹⁷⁷Lu) a molekuly, která se váže na PSMA (prostate-specific membrane antigen), který je lokalizován na buňkách rakoviny prostaty. Diagnostickou složkou teranostika ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 je PSMA, které se váže na malformované buňky, pak je pomocí zobrazovací metody – pozitronové emisní tomografie – detegován radioaktivní izotop ¹⁷⁷Lu, který současně svým emitovaným zářením ničí rakovinové buňky¹⁰. Na stejném principu spojení molekuly s vysokou afinitou k určité tkáni a radioaktivního izotopu prvku fungují i další schválené preparáty: Zevalin (⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan)¹², Bexxar (¹³¹I-tositumomab)¹³ a Lutathera (¹⁷⁷Lu-Dotatate)¹⁴.

Teranostika založená na použití NP jako nosičů se ukazuje jako velmi perspektivní oblast v oboru medicíny. Nanočástice mohou být navázány s terapeutickými a diagnostickými látkami, což umožňuje pacientům zpřístupnit cílenější a efektivnější diagnostiku a léčbu onemocnění.

Prvním „nano“ léčivem registrovaným FDA byl Doxil® v roce 1995. Účinná látka doxorubicin je chemoterapeutikum, které se používá v terapii různých onkologických onemocnění, včetně rakoviny prsu, ovarií a Kaposiho sarkomu. Doxorubicin je obalen nanočásticemi – liposomální vrstvou, která je perspektivní pro umístění ligandů vázajících se na nádorové buňky, což zajišťuje jeho cílenější přístup k těmto buňkám, působí tak selektivně a snižuje vedlejší účinky léčby¹⁵.

Nanočásticové teranostikum najde uplatnění i v zobrazovacích metodách, kde jsou již používány nanočástice zlata nebo oxidu železitého, které podporují zvýšení kvality obrazu a tím zlepšení diagnostiky při použití MRI. Příkladem takové látky je Combindex® (ferumoxtran-10), který obsahuje syntetické magnetické nanočástice zlepšující kontrast ve snímcích MRI a případně i diagnostiku rakoviny lymfatických uzlin. Na povrch NP lze pak navázat samotné léčivo. Combindex® je však prozatím předmětem klinických hodnocení¹⁶.

Jodované nanočástice jako kontrastní látka

Nízkomolekulární jodované látky jsou nejstaršími kontrastními látkami používanými v medicíně s uplatněním pro zobrazování tkání pomocí rentgenového záření – skiografická a CT angiografie. V současné době se v klinické praxi používá více než deset schválených jodovaných kontrastních látek¹⁷, které ovšem mají rychlou eliminaci z krve prostřednictvím ledvinové filtrace¹⁸, což omezuje optimální klinickou diagnostiku.

Nanočástice jsou v medicíně stále více využívány a jejich význam roste (viz tab. I a II).

Tabulka I

Příklady uplatnění NP v preklinické praxi (in vitro diagnostika)

Typ NP	Diagnostické využití	Lit.
Zlaté nanočástice	detekce viru SARS-CoV-2	19
NanoFlares	detekce rakovinných buněk v krvi	20
Nanočástice Europa	rychlá diagnostika viru ptačí chřipky podtypu H7	21
Polovodičové kvantové tečky	fluorescenční biomarker pro diagnostiku rakoviny	22
Uhlíkové nanotrubic	diagnostika a léčba rakoviny plic	23
Nanovlákna	detekce negativních DNA mutací a exprese genů	24

Tabulka II

Příklady uplatnění NP v klinické praxi

Název	Terapeutické využití	Lit.
Abelcet®, amfotericin B komplex	léčba invazivní mykotické infekce	25
Doxil®, nanolipozomy	léčba Kaposiho sarkomu, léčba karcinomu vaječnicků	26
ABRAXANE®, paclitaxel-albumin	léčba rakoviny prsu, plic a slinivky břišní	27
Genexol -PM, micelární paklitavex	léčba pokročilého stádia karcinomu prsu a plic	28
Rapamune®, nanokrystaly	prevence odmítnutí transplantovaného orgánu	29
Zlaté nanotyče	inhibice agregace β-amyloidu Alzheimerovy choroby	30

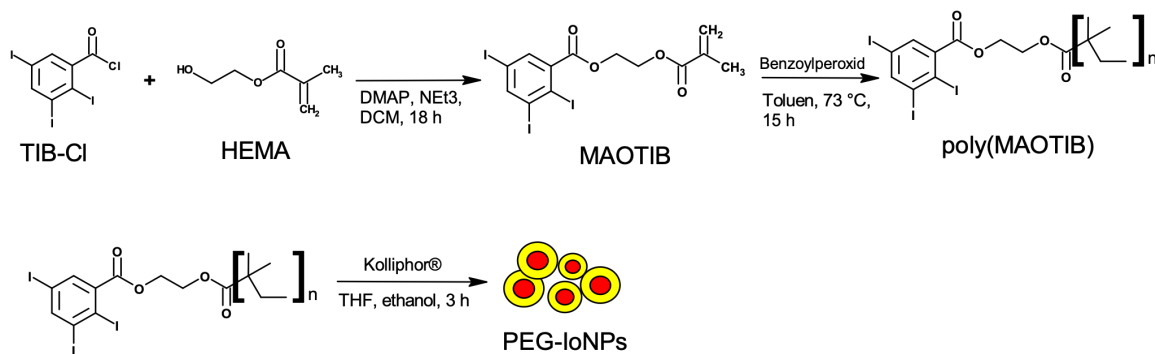
NP vykazují zásadní rozdíly oproti v současnosti používaným nízkomolekulárním kontrastním látkám v klinické praxi, a to díky svým fyzikálním vlastnostem – zejména velikosti, která prodlužuje jejich setrvání v krevním řečišti. Kromě toho mohou být nosiči léčiv a cílit na jakoukoliv strukturu/tkáň. Jedním z potenciálních teranostik jsou např. jodované nanočástice (IoNP), které mohou být vhodným doplňkem ke konvenčním jodovým kontrastním látkám. Ve srovnání s kovovými nanočásticemi (superparamagnetické nanočástice oxidů iontů – SPION, zlaté nanočástice – AuNP), které nejsou v těle rozložitelné, jsou právě IoNP biologicky odbouratelné. IoNP tak mají potenciál stát se základem moderního teranostického přístupu ke zlepšení léčby.

IoNP jsou tedy *diagnostikem* – mohou být uzavřeny do liposomů, které mají na povrchu tzv. binder (ligand) pro cílovou strukturu, v našem případě fibrin. Díky tomu mohou být selektivně vychytávány v krevním oběhu a zaměřeny na cílovou strukturu, čímž ji označí. Navíc může být na povrchu liposomu terapeutická molekula, například altepláza, plazmin nebo mikroplazmin, která umožňuje *terapeutický* účinek.

IoNP mohou být vyrobeny z monomeru MAOTIB (2-metakryloxyethyl(2,3,5-trijodobenzoát))³¹, viz obr. 1, a v literatuře jsou popisovány jako žádoucí kontrastní látky, například při zobrazování jater, sleziny a lymfatických uzlin³¹. Vykazují zvýšenou viditelnost v krvi a mohou být využity také při diagnostice rakovinných buněk v játrech³². IoNP navíc nabízejí nižší nefrotoxicitu (toxický účinek látek na ledviny) než nízkomolekulární látky a vykazují specifickou schopnost cílení. Zaměřují se na fibrin ve sraženině a jejich radiopacitní vlastnost (tedy nepropustnost pro rentgenové paprsky, jevící se na rentgenovém/CT snímku jako bílá oblast) tak může vizualizovat sraženinu *in situ*³³.

Laserová ablace s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS)

LA-ICP-MS je výkonná technika zobrazování prvků³⁴ a v některých případech i proteinů (hmotnostní cytometrie³⁵) s vynikajícími mezemi detekce, v ideálních případech až v řádech jednotek ng g⁻¹ (cit.^{34,36}). Jak bylo uvedeno výše, ischemická cévní mozková příhoda (spolu s rakovinou) je celosvětově hlavní příčinou úmrtí. Není proto překvapivé, že v posledních desetiletích roste zájem o zobrazování distribuce prvků/kovů a proteinů v biologických tkáních s cílem získat např. obecné prvkově-proteomické informace u konkrétního onemocnění^{37,38}. Barvení hematoxylinem a eosinem (HE) představuje základní tkáňové barvení používané v histologii, které slouží jako základní kámen v lékařské diagnostice a je často považováno za zlatý standard³⁹. Nicméně komplexní preklinický výzkum vyžaduje multidisciplinární přístup zahrnující studium farmakokinetiky a dynamiky tohoto potenciálního teranostika (IoNP pro detekci a léčbu mrtvice). Takové analýzy jsou možné právě díky použití této jedinečné metody LA-ICP-MS kombinující detekci více prvků a nově i proteinů. Stanovení distribuce proteinů/biomarkerů umožňuje tak popsat informace např. o rozsahu poškození mozku v zájmové oblasti. Tím se otevírá jedinečná možnost detegovat nově syntetizované léky/kontrastní látky, zkoumat jejich chování v modelovém organismu nebo sledovat jejich účinnost (spolu s kombinací histologických přístupů), a tím i úspěšnost celkové léčby. Proto může být tato zobrazovací technika velmi vhodná a může být využita jako tzv. „zlatý standard“ zobrazovací metody pro výzkum např. výše zmiňovaných IoNP použitelných v oblasti teranostické medicíny.



Obr. 1. Schéma syntézy IoNP. Monomer je připraven esterifikační reakcí trijodobenzoylchloridu (TIB-Cl) s 2-hydroxyethylmethakrylátem (HEMA) v prostředí dimethylaminopyridinu (DMAP) a triethylaminu (NEt₃) rozpuštěného v dichlormethanu (DCM). Polymerace probíhá mechanismem radikálové polymerizace. Pomocí tetrahydrofuranu (THF), polyMAOTIB, ethanolu a stabilizačního surfaktantu – polyethylenglykolu (PEG – komerční název Kolliphor®) jsou vytvořeny IoNP

Experimentální část

Příprava vzorků

In vivo: Laboratorním potkanům byla pod narkózou vyvolána okluze střední mozkové tepny (MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion). MCAO operace byla realizována zákrokem, kdy do krční tepny potkana byla aplikována umělá, baryem značená sraženina na bázi lidského fibrinu (umělý trombus), která se následně usadila ve střední mozkové tepně⁴⁰. Během terapeutického okna bylo potkanům aplikováno trombolitikum (např. altepláza) a IoNP.

Ex-vivo: Po eutanázii zvířete (potkana) byl odebrán vzorek krve a vyjmut mozek, společně s dalšími orgány (převážně játra, ledviny, slezina). (I) Orgány byly uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Takto chladem fixované orgány byly následně zality do kryo-média a nakrájeny na kryotomu do podoby histologických řezů o tloušťce $10\text{ }\mu\text{m}$. Přenos a skladování řezů byly realizovány uchováním na podložním skle při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (II) Vzorky krve byly pipetovány na podložní sklo.

Analýza LA-ICP-MS

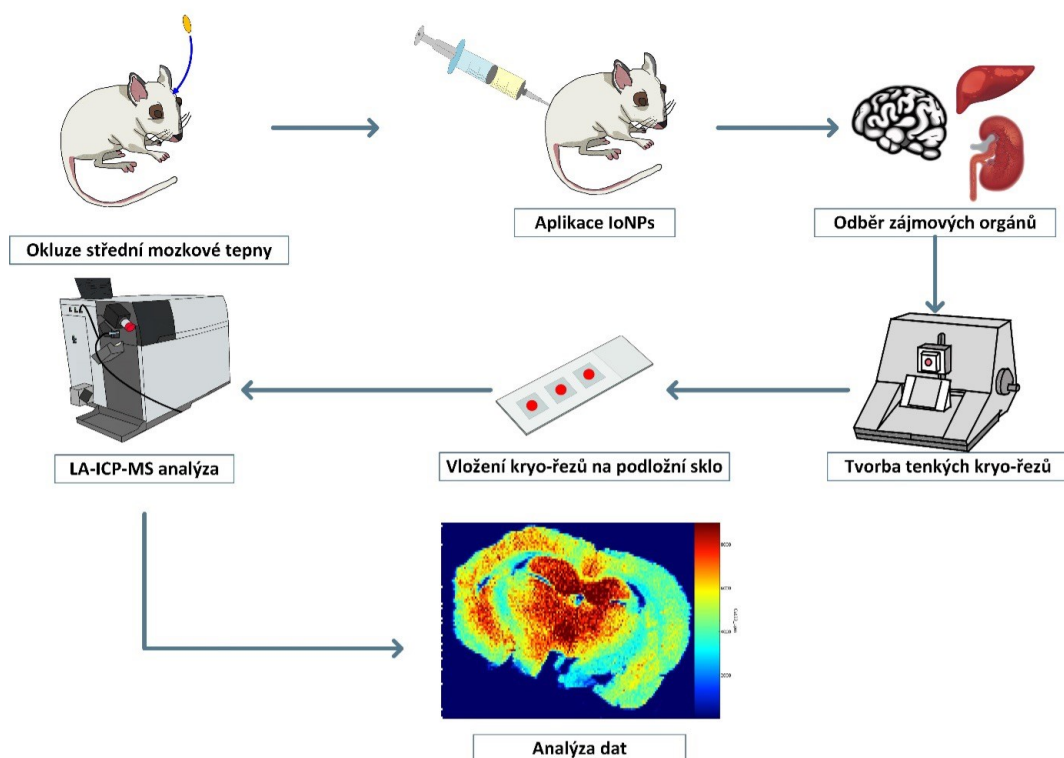
Vzorky byly upevněny do komory laserového ablačního systému společně s kalibračními standardy. Byla použita externí kalibrace s interním standardem telluru

a definovaným obsahem jodu ($0, 5, 10, 50, 100, 200$ a $500\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$), které věrně napodobují charakteristiky neznámých vzorků (tzv. matrix-matched standardy, tedy standardy obsahující stejnou matici – tkáň – jako samotný vzorek). Ty slouží nejen ke kvantifikaci množství jodu, ale také k minimalizaci maticových efektů a potlačení různé ablační rychlosti^{41,42}. Podmínky analýzy byly optimalizovány pro kompletní ablací tkáňové hmoty z podložního skla, a vysoké ionizační účinnosti pro zvolené prvky (viz tab. III). Byly měřeny prvky: ^{31}P (zobrazující celý řez tkáně), ^{127}I (stanovení distribuce a farmakokinetiky IoNP), ^{125}Te (interní standard). Získané hmotnostní spektrum bylo kombinováno se záznamem pozice laserového paprsku a skládáním intenzifikovaných pixelů vznikla prvková distribuční mapa zájmového prvku. Celá metodologie přípravy a analýzy je znázorněna na obr. 2.

Výsledky a diskuse

Tělní tekutiny

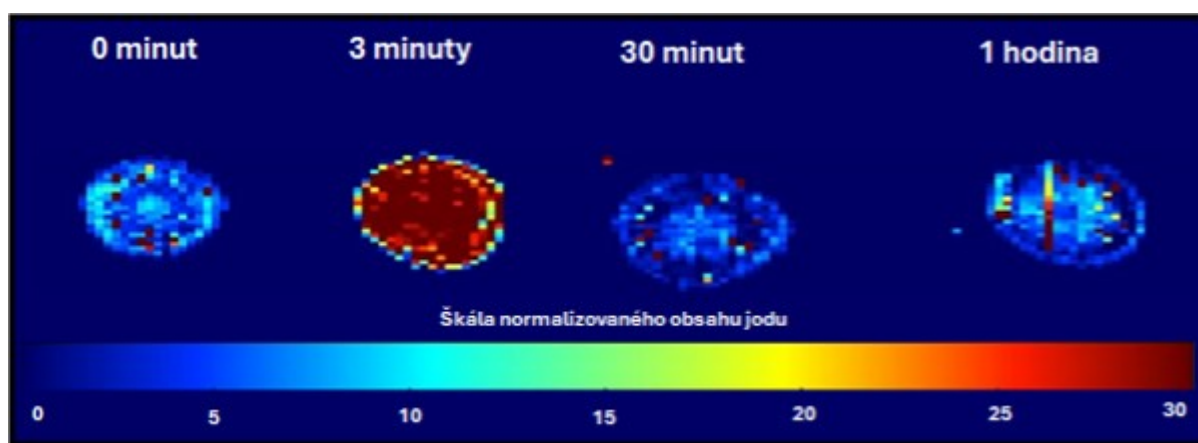
Krev díky své viskozitě vykazovala tzv. „efekt kávové skvrny“ (coffee stain effect). Zmíněný jev se projevil tím, že nejvyšší množství jodu bylo naměřeno na periferních kapkách a uprostřed kapky. Tento artefakt je viditelný i na prvkové distribuční mapě jodu (viz obr. 3) a zanáší do



Obr. 2. Postup přípravy vzorků pro analýzu pomocí LA-ICP-MS

Tabulka III
Podmínky analýzy LA-ICP-MS pro tkáňové vzorky

<i>Laserový ablační systém LSX-213G2+ (Teledyne, Photon Machines, USA)</i>	
Energie laserového záření, J cm ⁻²	4,0
Opakovací frekvence laserového paprsku, Hz	20
Průměr laserového paprsku, μm	150
Rychlost posunu, μm s ⁻¹	200
Příprava laserového paprsku s uzavřenou clonou, s	10
Posun mezi liniemi, μm	150
Průtok nosného plynu, l min ⁻¹	1,0
<i>Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7900ce (Agilent, Japonsko)</i>	
Příkon do indukční cívky ICP, W	1550
Průtok plazmového plynu, l min ⁻¹	17,0
Celkový integrační čas, s	0,5250



Obr. 3. Normalizovaný obsah jodu ve vzorcích krve potkana po aplikaci IoNP analyzovaných pomocí LA-ICP-MS

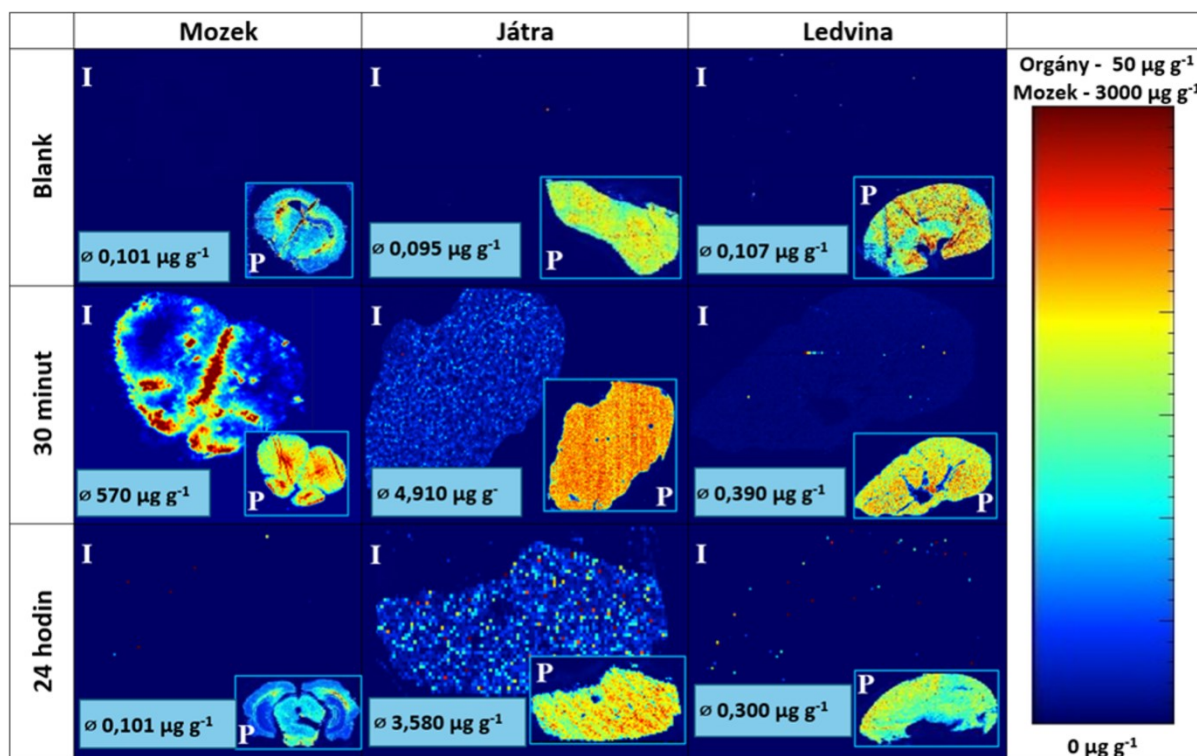
dat heterogenitu stanovení obsahu v celé kapce. Směrnice pro normalizaci byla získána pomocí tkáňových standardů jodu. Tento způsob normalizace byl zvolen z důvodu zajištění porovnatelnosti mezi jednotlivými měřeními. Jelikož ale standardy nereflektují matici krve, byla normalizace vztažena na bezrozměrné jednotky. Již ve 3. minutě od aplikace IoNP byl zaznamenán nárůst množství jodu (viz obr. 3, 3 minuty), což indikuje rychlou distribuci IoNP v krevním řečišti a dále do organismu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že již po 30 minutách od jejich aplikace se obsah jodu v krvi vrátil na původní hodnoty (viz obr. 3, 30 minut).

Orgány

Byly analyzovány tenké řezy tkání potkana (mozek, játra, ledviny) a výsledky jejich distribučních map jodu v orgánech popisuje obr. 4. Můžeme zde také pozorovat

časové značky eutanazie potkana po aplikaci IoNP (0, 30 min a 24 h). Pro lepší vizualizaci struktury orgánů byly distribuční mapy jodu v orgánech doplněny mapami fosforu. Hodnota „MAX“ vedle každé distribuční mapy označuje maximální nastavenou hodnotu obsahové škály, která je znázorněna červeně.

Sdružené skupiny distribučních map orgánů vykazují podobný trend jako u krve. Zde se 30 minut po aplikaci IoNP ve velkém množství dostaly z krevního řečiště do mozku (průměrný obsah v řezu tkáně 570 μg g⁻¹). Zde lze pozorovat značnou nehomogenitu distribuce jodu po 30 minutách po indukcii IoNP (viz obr. 4, Mozek – 30 minut). IoNP se zdržují pouze v místech s vysokým obsahem železa, což naznačuje distribuci v cévách bez větších průniků do nervové tkáně. Pro správnou vizualizaci sraženiny je potřeba optimalizace kroku „vymytí“ IoNP z krevního řečiště mozkové tkáně, aby nedocházelo k navyšování signálu v jiných místech mozkové tkáně, než kde je



Obr. 4. Stanovení distribuce a průměrného obsahu jodu v tenkých řezech orgánů po aplikaci IoNP pomocí LA-ICP-MS

přítomna sraženina. Pak je možná správná interpretace výsledků. Průměrný obsah jodu v řezu mozkové tkáně po 24 hodinách byl stanoven na 0,101 µg g⁻¹. Tento obsah je stejný, jako u mozku potkana bez aplikace IoNP. Můžeme tedy říci, že IoNP jsou po 24 hodinách plně vyloučeny z tohoto orgánu. Detekci jodu v dalších orgánech můžeme pozorovat, že odbourání IoNP probíhá v játrech (4,910 µg g⁻¹ po 30 min a 3,580 µg g⁻¹ po 24 hodinách, ve srovnání s průměrným obsahem jodu bez aplikace IoNP, tedy 0,095 µg g⁻¹, viz obr. 4, játra), tedy vyloučením přes žlučové cesty do střev. Oproti detekci jodu v ledvinách, jejichž obsah po 30 min (0,390 µg g⁻¹) i 24 hodinách (0,300 µg g⁻¹) po aplikaci IoNP je jen nepatrně zvýšen oproti obsahu v ledvině bez aplikace IoNP (0,107 µg g⁻¹). Již po 24 hodinách dochází tedy k vyloučení většiny IoNP z organismu.

Výhodou analýzy těchto biologických vzorků pomocí LA-ICP-MS je nejen stanovení jejich distribuce, posouzení (ne)homogenity v tkáni, ale také kvantifikace a možnost výpočtu průměrného obsahu jodu v tkáni, a tedy stanovení farmakokinetiky těchto IoNP. Nevýhodou je stanovení IoNP jako signálu ¹²⁷I, nikoli ve formě „single nanoparticle modu“, tedy detekci jednotlivých nanočástic, která se v současné době rutinně zatím nepoužívá (z důvodu např. nedostatečně vyspělé instrumentace, velice složité optimalizace metody, či dlouhé doby a vysoké ceny analýzy). Tato nevýhoda znemožňuje získání informace o jejich

biodegradabilitě (rozložení biologickými procesy), tedy zda jsou IoNP v orgánech v původní formě nanočástic, nebo již rozložené. Tato informace může být následně získána pomocí zobrazení elektronovým mikroskopem.

Závěr

Výhodou LA-ICP-MS je při výzkumu celé řady onemocnění nejen zobrazení samotné distribuce zájmových prvků, ale také možnost jejich kvantifikace, a to jak celkově (v celém řezu tkáně), tak v její zájmové oblasti. Můžeme tedy popisovat farmakokinetiku chemických látek určených k použití v lékařské diagnostice, léčbě nebo prevenci nemoci založených na prvku, který není organismu vlastní (abiogenní). V takovém případě můžeme obsah a distribuci léčiva snadno sledovat. V našem případě je jod sice v organismu částečně zastoupen (např. štítná žláza), jak je ale patrné z analýz orgánů potkanů neléčených IoNP, jeho reálné množství vyjma štítné žlázy je v tkáních prakticky zanedbatelné.

LA-ICP-MS se tedy v posledních letech stává velice účinným nástrojem pro vývoj a testování léčiv, stanovení jejich farmakokinetiky a v neposlední řadě také účinnosti. Ruku v ruce jde stálý vývoj nové instrumentace, která již v dnešní době dovoluje nejen nižší meze detekce, ale také mnohem rychlejší a tím levnější analýzy.

Vypracováno s finanční podporou Grantové agentury Masarykovy univerzity v rámci Programu podpory studentského výzkumu – Podpora vynikajících diplomových prací, číslo projektu MUNI/C/0002/2023.

LITERATURA

- Global Burdens of Disease (GBD): Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020. <https://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>, staženo 12. 9. 2024.
- Hu H. J., Song M. K.: *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 26, 2706 (2017).
- Gallacher K. I., Batty G. D., McLean G., Mercer S. W., Guthrie B., May C. R., Langhorne P., Mair F. S.: *BMC Med.* 12, 1 (2014).
- Dusen R. A V., Abernethy K., Chaudhary N., Paudyal V., Kurmi O.: *BMJ Open* 13, 3 (2023).
- Fifi J. T., Mocco J.: *Lancet Neurol.* 19, 713 (2020).
- Škoda O., Herzig R., Mikulík R., Neumann J., Václavík D., Bar M., Šaňák D., Tomek A., Školoudík D.: *Ceska Slov. Neurol. Neurochir.* 79, 351 (2016).
- Ospel J. a 13 spoluautorů: *Stroke* 52, 304 (2021).
- Powers W. J. a 18 spoluautorů: *Stroke* 50, e344 (2019).
- Kim J., Park J. E., Nahrendorf M., Kim D. E.: *J. Stroke* 18, 286 (2016).
- Theek B., Rizzo L., Ehling J., Kiessling F., Lammers T.: *Clinical Translational Imaging* 2, 67 (2014).
- Funkhouser J.: *Curr. Drug Discovery* 2, 17 (2002).
- Langbein T., Weber W., Eiber M.: *J. Nucl. Med.* 60, 13S (2019).
- T.C.f.D.E.a.R. (CDER): Drugs*, (2022) <https://www.fda.gov/drugs>, staženo 12. 9. 2024.
- Grillo-López A. J.: *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2, 485 (2002).
- Ziessman H. A., O'Malley J. P., Thrall H. J., v knize: *Nuclear Medicine*, 4. vyd., str. 265. Elsevier, Philadelphia 2014.
- Hennrich U., Kopka K.: *Pharmaceuticals* 12, 114 (2019).
- Barenholz Y., Peer D.: *J. Controll. Release* 160, 117 (2012).
- Huang Y., Hsu J., Koo H., Cormode D.: *Theranostics* 12, 796 (2022).
- You S. a 10 spoluautorů: *J. Controll. Release* 226, 258 (2016).
- Dean P. B., Kivisaari L., Korman M.: *Invest. Radiol.* 18, 368 (1983).
- Wang J., Drelich A., Hopkins C., Mecozzi S., Li L., Kwon G., Hong S.: *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 14, e1754 (2022).
- Halo T. a 11 spoluautorů: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17104 (2014).
- Yeo S. a 11 spoluautorů: *Sci. Rep.* 7, 7933 (2017).
- Farias P., Santos B., Fontes A., v knize: *Micro and Nano Technologies in Bioanalysis: Methods and Protocols*, str. 407. Springer, Totowa 2009.
- Sheikhpour M., Naghinejad M., Kasaeian A., Lohrasbi A., Shahracini S., Zomorodbakhsh S.: *Int. J. Nanomed.* 15, 7063 (2020).
- Sutariya V. B., Pathak Y.: *Biointeractions of Nanomaterials*, Taylor and Francis Group, Boca Raton 2014.
- Hamill R.: *Drugs* 73, 919 (2013).
- Cook D., Brown D., Alexander R., March R., Morgan P., Satterthwaite G., Pangalos M.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 13, 419 (2014).
- Miele E., Spinelli G., Miele E., Tomao F., Tomao S.: *Int. J. Nanomed.* 4, 99 (2009).
- Cormier J., Awen A., Kwade A., Van de Voorde M.: *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production: Innovation and Production*. Wiley, Weinheim 2016.
- Haeri A., Osouli M., Bayat F., Alavi S., Dadashzadeh S.: *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.* 46, S1 (2018).
- Singh R. P., Singh K. R. B., Singh J., Adetunji C.: *Nanotechnology for Drug Delivery and Pharmaceuticals*. Elsevier, London 2023.
- Wallyn J., Anton N., Serra C. A., Bouquoy M., Collot M., Anton H., Weickert J. L., Messaddeq N., Vandamme T. F.: *Acta Biomater.* 66, 200 (2018).
- Aviv H., Bartling S., Kiesling F., Margel S.: *Biomaterials* 30, 5610 (2009).
- Hallouard F., Anton N., Choquet P., Constantinesco A., Vandamme T.: *Biomaterials* 31, 6249 (2010).
- Limbeck A., Galler P., Bonta M., Bauer G., Nischkauer W., Vanhaecke F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6593 (2015).
- Konz I., Fernández B., Fernández M., Pereiro R., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2113 (2012).
- Van Acker T., Theiner S., Bolea-Fernandez E., Vanhaecke F., Koellensperger G.: *Nat. Rev. Methods Primers* 3, 18 (2023).
- Pornwilar M. M., Merle U., Weiskirchen R., Becker J. S.: *Int. J. Mass Spectrom.* 354, 281 (2013).
- Matusch A., Depoylu C., Palm C., Wu B., Hoglinger G. U., Schafer M. K. H., Becker J. S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 161 (2010).
- World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington D.C 2007.
- Wünschova A. V. a 13 spoluautorů: *Pharmaceutics* 12, 1207 (2020).
- Vaculovic T., Warchilová T., Čadkova Z., Szaková J., Tlustoš P., Otruba V., Kanický V.: *Appl. Surf. Sci.* 351, 296 (2015).
- Anyz J., Vyslouzilova L., Vaculovic T., Tvrdonova M., Kanický V., Haase H., Horak V., Stepankova O., Heger Z., Adam V.: *Sci. Rep.* 7, 40169 (2017).

M. Kuchynka^{a,b,c}, J. Biskupič^a, M. Onuščáková^a, P. Scheer^c, J. Hložková^c, and V. Kanický^b (^a *Department of Chemical Drugs, Masaryk University, Brno,* ^b *Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno,* ^c *Department of Pharmacology and Toxicology, Masaryk University, Brno, Czech Republic*): **New Opportunities for Theranostics Research in Stroke**

Stroke, myocardial infarction, and pulmonary embolism represent a significant health burden for modern society, with their primary causes being blood clots and damage to the endothelial lining of blood vessels. Accurate and rapid diagnosis of these clots, particularly determining their age, is crucial for optimal treatment selection, such as thrombolysis (pharmacological dissolution of the clot) or thrombectomy (mechanical removal of the clot). However, existing diagnostic methods do not achieve the required levels of accuracy and efficiency. This article explores the potential of

iodinated nanoparticles (IoNPs) based on polyiodinated biodegradable polymers, which can selectively target specific components such as fibrin, thereby enabling visualization of blood clots using X-ray imaging techniques like computed tomography (CT) or fluoroscopy. The nanoparticles have the capability not only to visualize clots but also to estimate their age, which could significantly support a modern theranostic approach that combines diagnosis and therapy. The article also demonstrates the possibilities of testing the pharmacokinetics of these theranostics using a model organism (rat), employing the method of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). This approach contributes to a better understanding of the biodegradability of potential therapeutics and represents a key step in preclinical evaluation.

Keywords: stroke, theranostic, laser ablation, nanoparticles



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.