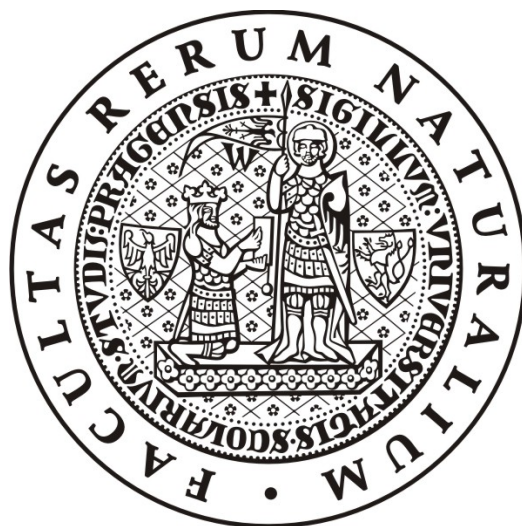


**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA BIOCHEMIE**



Bakalářská práce

**Příprava analogů MRI kontrastních látek a studium jejich  
internalizace na buněčných kulturách**

Preparation of analogues of MRI contrast agents and study of their  
internalization on cell cultures

**Matyáš Krijt**

**Praha 2010**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucí práce RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D., školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D. a konzultanta doc. RNDr. Jana Černého, Ph.D. a všechny prameny jsem řádně citoval.“

V Praze dne 3. 6. 2010

## Abstract

Magnetic resonance imaging (MRI) is a commonly used non-invasive method to examine internal organs and soft tissues. In order to increase signal intensity and improve specificity contrast agents (CAs) have been developed, which affect  $T_1$  or  $T_2$  relaxation times.  $T_1$ -contrast agents are mostly based on Gd(III) complexes.

The aim of this thesis was to prepare analogues to commercial Gd(III)-CAs by changing the central atom for europium and use europium fluorescence properties for observing CAs' cell-distribution. However, due to strong cell auto-fluorescence the fluorescence of complexes did not provide convincing images reporting their biochemical fate. The toxicity of prepared complexes was tested on adherent cell cultures and evaluated by Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS). Internalization of the CAs' analogues was confirmed also by elemental analysis (ICP-MS).

(In Czech)

**Key words:** magnetic resonance imaging,  $T_1$ -contrast agents, europium complexes, toxicity, fluorescence, excitation, emission

## Abstrakt

Magnetická rezonance je neinvazivní metoda běžně využívaná pro vyšetření vnitřních orgánů a měkkých tkání. Za účelem zvýšení intenzity a zlepšení specifity byly vyvinuty kontrastní látky, které ovlivňují  $T_1$ - a  $T_2$ -relaxační časy. Většina  $T_1$ -kontrastních látek jsou komplexní sloučeniny trojmocného gadolinia.

Cílem této práce bylo připravit analogické komplexní sloučeniny k dnes používaným Gd(III) kontrastním látkám záměnou centrálního atomu gadolinia za atom europia a využít jeho fluorescenčních vlastností ke sledování buněčné-distribuce kontrastních látek. Kvůli silné auto-fluorescenci použitých buněčných kultur však nebylo možné přesně definovat biologický osud europitých komplexů. Dále byly získány údaje ohledně toxicity pomocí průtokového cytometru a údaje o výskytu europia v buňkách pomocí elementární analýzy (ICP-MS).

**Klíčová slova:** magnetická rezonanční tomografie,  $T_1$ -kontrastní látky, europité komplexy, toxicita, fluorescence, emise, excitace

# Obsah

1 Úvod .....	8
1.1 Vývoj MRI .....	8
1.2 Magnetická rezonanční tomografie (MRI).....	8
1.2.1 Princip MRI .....	8
1.2.2 Magnetizace.....	9
1.2.3 Larmorova frekvence .....	11
1.2.4 Radiofrekvenční pulz a Fourierova transformace.....	11
1.2.5 Chemický posun .....	12
1.2.6 Tomografie vnitřních orgánů.....	13
1.2.7 Relaxace .....	15
1.2.7.1 Podélná (longitudinální) relaxace $T_1$ .....	15
1.2.7.2 Příčná (transversální) relaxace $T_2$ .....	16
1.3 Kontrastní látky .....	17
2. Motivace a cíl práce.....	19
3. Experimentální část .....	20
3.1 Použité chemikálie.....	20
3.1.1 Chemikálie.....	20
3.1.2 Roztoky použité při práci s buňkami .....	20
3.2 Přístroje a techniky .....	21
3.2.1 Fluorescenční mikroskopie.....	21
3.2.2 Centrifugace.....	22
3.2.3 Zjišťování počtu buněk .....	22
3.2.4 Stanovení obsahu europia v buňkách pomocí ICP-MS.....	22
3.2.5 Spektrální metody .....	23
3.2.6 NMR.....	23
3.3 Práce s buněčnými kulturami .....	24
3.3.1 Buněčné linie .....	24
3.3.2 Kultivace .....	24
3.3.3 Pasážování buněk.....	24
3.3.4 Fixace .....	24
3.3.5 Internalizace komplexů .....	25
3.4 Syntetická část.....	26

3.4.1 Syntéza $\text{Na}_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$ .....	26
3.4.2 Syntéza $(\text{NH}_4)_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$ .....	26
3.4.3 Syntéza $\text{NH}_4[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dota})]$ .....	27
3.4.4 Syntéza bis(2-hydroxoethylamidu) diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA-BA) .....	27
3.4.5 Syntéza $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$ .....	28
3.4.6 Syntéza 10-hydroxypropyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (DO3A-HP) .....	28
3.4.7 Syntéza $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$ .....	28
3.4.8 Syntéza 10- $\{[(4\text{-izothiokyanatobenzyl})(\text{hydroxy})\text{fosforyl}]\text{methyl}\}$ -1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny .....	29
3.4.9 Konjugace $\text{DO3AP}^{\text{NCS}}$ s per-6-amino- $\beta$ -cyklodextrinem, příprava $\text{L}_7\text{-}\beta\text{-CD}$ .....	29
3.4.10 Syntéza $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$ .....	29
4. Výsledky a diskuze .....	31
4.1 Koncentrace zásobních roztoků .....	31
4.2 Internalizace europitých komplexů .....	32
4.2.1 K71 (myší linie B-lymfocytů) .....	32
4.2.2 HeLa buňky .....	33
4.2.3 Fibroblasty .....	37
4.3 Mikroskopie .....	40
5. Závěr .....	42
6. Použitá literatura .....	43
7 Přílohy .....	45
7.1 Excitační spektrum komplexů .....	45
7.2 Emisní spektrum komplexů .....	46
7.3 Emisní spektrum značených buněčných suspenzí .....	47

## SEZNAM ZKRATEK

ATCC	původ buněčných linií (American Type Culture Collection)
BMS	chemický posun indukovaný magnetickou susceptibilitou vzorku (Bulk Magnetic Susceptibility Shift)
DMEM	kultivační médium (Dulbeccos modified Eagle's medium)
DO3A-HP = H <sub>3</sub> do3a-hp	10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DO3AP <sup>ABn</sup>	10- {[ (4-aminobenzyl)(hydroxy)fosforyl]methyl }-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová kyselina
DO3AP <sup>NCS</sup> = H <sub>4</sub> do3ap <sup>NCS</sup>	10- {[ (4-izothiokyanatobenzyl)(hydroxy)fosforyl]methyl }-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová kyselina
DOTA = H <sub>4</sub> dota	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA = H <sub>3</sub> dtpa	diethylentriaminpentaoctová kyselina
DTPA-BA = Hdtpa-ba	bis(anhydrid) diethylentriaminpentaoctové kyseliny
DTPA-EA = H <sub>3</sub> dtpa-ea	bis(2-hydroxoethylamid) diethylentriaminpentaoctové kyseliny
FACS	analyzační průtokový cytometr (Fluorescence-activated cell sorter)
FBS	sérum použité k přípravě kultivačních médií (fetální hovězí sérum)
HBSS	pufr použitý pro omytí buněk před spektrofotometrií (Hank's Buffer Stock Solutions)
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy)
L	jednotka objemu, litr
mL	jednotka objemu, mililitr
M	jednotka koncentrace, mol L <sup>-1</sup>
mM	jednotka koncentrace, mmol L <sup>-1</sup>
MRI	magnetická rezonanční tomografie (Magnetic Resonance Imaging)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	pufr používaný k promývání adherentních buněk (Phosphate-Buffered Saline)
RPMI 1640	kultivační médium (Roswell Park Memorial Institute)
<i>t</i> Bu <sub>3</sub> DO3A	1,4,7-tri- <i>terc</i> -butyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát

# 1 Úvod

Jednou z nejpoužívanějších zobrazovacích technik na poli klinické medicíny a biomedicínského výzkumu je v současné době magnetická rezonance neboli MRI (Magnetic Resonance Imaging). Jedná se o metodu, která neinvazivně a bez použití ionizujícího záření poskytuje vysoce kvalitní obrazy vnitřních tkání a orgánů. Pouze vysoké pořizovací i provozní náklady negativně ovlivňují možný potenciál této metody.

## 1.1 Vývoj MRI

Základy magnetické rezonance položili O. Stern (NC 1943) a W. Pauli (NC 1945) počátkem 20. století, když nejprve O. Stern poukázal na to, že některé atomy mají magnetický moment a chovají se jako slabé magnety<sup>[1,2]</sup>. Ve stejné době W. Pauli navrhl, že energetické hladiny atomových jader s magnetickým momentem jsou štěpeny vlivem silného magnetického pole na energetické hladiny<sup>[3]</sup>. Na předešlé úspěchy navázal O. Stern ve spolupráci s W. Gerlachem, když postulovali Sternův-Gerlachův efekt dokazující, že jaderné spiny těchto atomů jsou ovlivňovány přítomností vnějšího magnetického pole<sup>[4]</sup>. Držitelem Nobelovy ceny za rozvoj rezonančních metod je také I. I. Rabi (NC 1944), který vyvinul techniku pro měření jaderného magnetického spinu<sup>[5]</sup>. Další rozvoj těchto metod provedli nezávisle prvním přesným měřením jaderného magnetismu a detekcí NMR signálu F. Bloch a E. M. Purcell (oba NC 1952)<sup>[6,7]</sup>. V roce 1973 P. C. Lauterbur prokázal, že působením lineárního gradientu na odlišná místa v tkáních lze získat rozdílné signály, ze kterých je možné složit obraz<sup>[8]</sup>. Počátkem 80. let tak byla mezi klinické radiologické metody zařazena i nukleární magnetická rezonance, která se později, kvůli nedůvěře laické veřejnosti ke slovu nukleární/jaderná, ujala pod pojmem magnetická rezonance<sup>[9]</sup>.

## 1.2 Magnetická rezonanční tomografie (MRI)

### 1.2.1 Princip MRI

Technikou magnetické rezonance lze pozorovat především jádra, která mají nenulový spin. Takové jádro, jakožto pohybující se kladně nabitá částice, vykazuje magnetický moment a chová se jako malý magnet budící magnetické pole určité intenzity<sup>[10]</sup>.

V lidském organismu se přirozeně vyskytuje několik izotopů splňující tuto podmínku. Jedná se především o izotopy  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{23}\text{Na}$  a  $^{31}\text{P}$ <sup>[11]</sup>, vhodnost vybraných izotopů pro účely magnetické rezonance shrnuje tabulka 1 na straně 9<sup>[12]</sup>.



**Tabulka 1: Porovnání vlastností vybraných izotopů pro účely MRI.** Vlastnosti izotopů: *spin, přirozený výskyt, gyromagnetický poměr a citlivost* charakterizují potenciál využití pro NMR či MRI. Rezonanční NMR frekvence odpovídá magnetickému poli o intenzitě  $B_0 = 11,47$  T.

Jádro	Spin	Přirozený výskyt [%]	$\gamma$ [ $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	NMR frekvence při 11,74 T [MHz]	Citlivost [%]
$^1\text{H}$	1/2	99,99	26,75	500,0	100
$^2\text{H}$	1	0,01	4,11	76,8	0,0001
$^3\text{H}$	1/2	–	28,54	533,3	0
$^{12}\text{C}$	0	98,93	–	–	–
$^{13}\text{C}$	1/2	1,07	6,73	125,7	0,02
$^{14}\text{N}$	1	99,63	1,93	36,1	0,1
$^{15}\text{N}$	1/2	0,37	–2,71	50,7	0,0004
$^{16}\text{O}$	0	99,96	–	–	–
$^{19}\text{F}$	1/2	100	25,18	470,4	83
$^{31}\text{P}$	1/2	100	10,84	202,4	6,6

$\gamma$  – gyromagnetický poměr

Vzhledem k tomu, že ca. 70 % tělesné hmotnosti tvoří voda<sup>[13]</sup>, je obraz MRI nejčastěji generován pomocí izotopu  $^1\text{H}$ . Jádro atomu vodíku je tvořeno jediným protonem se spinovým kvantovým číslem  $I = 1/2$ . Magnetický moment ( $m_I$ ) může nabývat  $2I + 1$  hodnot. Orientace jaderného spinu je za běžných podmínek náhodná (Obr. 1, str. 10). Pokud však vložíme atom vodíku do magnetického pole o intenzitě  $B_0$ , projeví se magnetické vlastnosti atomového jádra, především magnetický moment charakterizovaný rovnicí<sup>[14]</sup>:

$$\mu = \gamma \cdot \hbar \cdot m_I,$$

kde  $\hbar$  je redukovaná Planckova konstanta ( $\hbar = h/2\pi$ ).

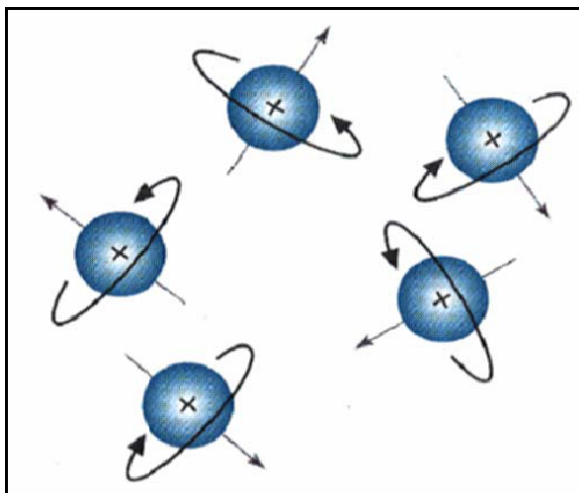
### 1.2.2 Magnetizace

Vodíková jádra vložená do silného magnetického pole zaujímají jednu z orientací (Obr. 2, str. 10), kterou jim dovoluje magnetické kvantové číslo ( $I$ ). Stav pro  $m_I = 1/2$  se označuje jako  $\alpha$  a nabývá energie:

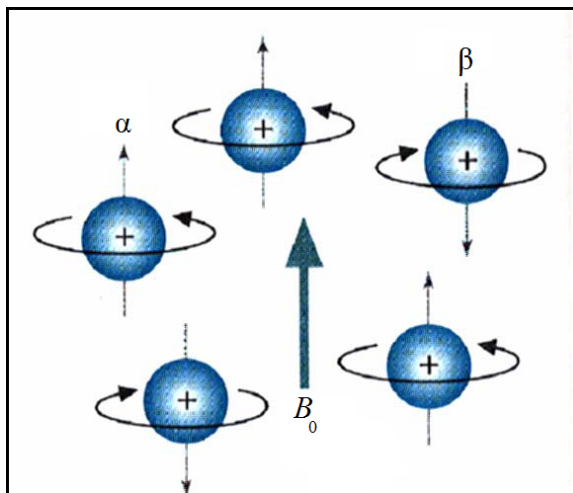
$$E_\alpha = -m_I \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 = -1/2 \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

a stav pro  $m_I = -1/2$  se označuje jako stav  $\beta$  a nabývá energie:

$$E_\beta = -m_I \gamma \cdot \hbar \cdot B_0 = 1/2 \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$
<sup>[15]</sup>



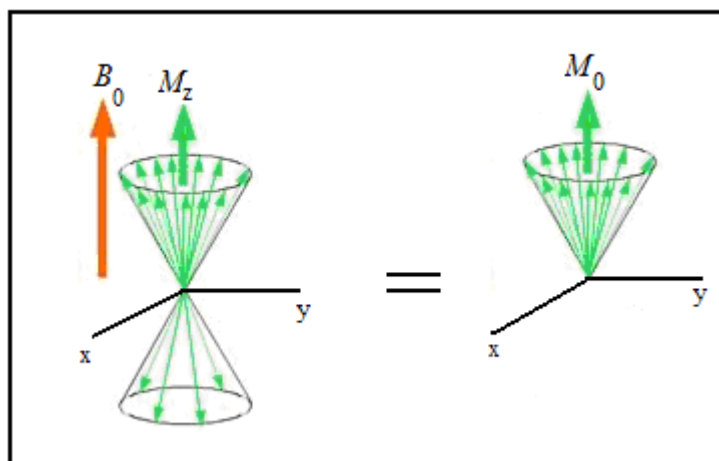
Obr. 1: Náhodná orientace jaderných spinů



Obr. 2: Orientace jaderných spinů v magnetickém poli. Orientace  $\alpha$  ve směru magnetické indukce, v protisměru orientace  $\beta$ .

Upraveno dle: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/1303.gif>

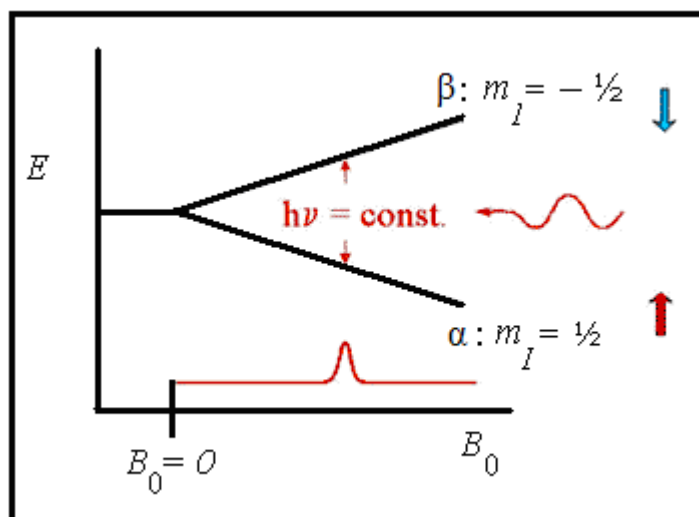
Oba stavy se liší energetickou náročností, potažmo četností výskytu. Součet magnetických momentů početněji zastoupeného stavu  $\alpha$  udává hodnotu podélné magnetizace  $M_z$ , respektive  $M_0$ , (Obr. 3), která vyjadřuje součet všech vektorů magnetizace v ose  $z$ <sup>[16]</sup>.  $M_0$  nelze pozorovat přímo kvůli silné intenzitě magnetického pole<sup>[17]</sup>.



Obr. 3: Zastoupení stavů  $\alpha$  a  $\beta$  a výsledná magnetizace.

Upraveno dle <http://www.ixsea-dev.info/en/technology/4/nuclear-magnetic.html>

Čím silnější magnetickou indukcí působí vnější magnet, tím je větší energetický rozdíl stavů  $\alpha$  a  $\beta$  ( $\Delta E = E_\beta - E_\alpha$ , Obr. 4, str. 11), vyšší počet výskytu stavu  $\alpha$ , výsledná hodnota  $M_0$  a citlivost metody<sup>[14]</sup>.



**Obr. 4: Zeemanův jev atomového jádra vodíku.** Rozdíl velikosti štěpení energetických hladin závisí na velikosti vnější magnetické indukce.

Upraveno dle: [www.helmholtz-berlin.de/media/media/forschung/energie/si\\_photovoltaik/analytische\\_methoden/zeemanaufspaltung.gif](http://www.helmholtz-berlin.de/media/media/forschung/energie/si_photovoltaik/analytische_methoden/zeemanaufspaltung.gif)

### 1.2.3 Larmorova frekvence

Výsledné působení magnetického momentu jádra a vnějšího magnetického pole způsobuje, že se magnetický moment jádra pohybuje po plášti pomyslného kuželu a koná tzv. precesní pohyb<sup>[10]</sup>, který je charakterizován Larmorovou frekvencí:

$$\nu_L = \gamma \cdot B_0.$$

Velikost Larmorovy frekvence závisí na gyromagnetickém poměru  $\gamma$  (pro  $^1\text{H}$   $\gamma = 42,6 \text{ MHz/T}$ ) a indukci vnějšího magnetického pole. V případě působení magnetické indukce  $B_0 = 1,5 \text{ T}$  by se Larmorova frekvence rovnala:

$$\nu_L = 42,6 \cdot 1,5 = 63,9 \text{ MHz} \approx 64 \text{ MHz},$$

což by znamenalo, že magnetický moment jádra  $^1\text{H}$ , respektive protonu, provede 64 milionů otáček za sekundu<sup>[18]</sup>.

### 1.2.4 Radiofrekvenční pulz a Fourierova transformace

Pro získání signálu je zapotřebí splnit rezonanční podmínku a vyvolat tak měřitelnou změnu. Působením rezonanční frekvence o velikosti odpovídající Larmorově frekvenci způsobí intenzita pulzu  $B_1$  excitaci atomového jádra, která se projeví vychýlením/sklopením vektoru magnetizace  $M_z$  o určitý úhel v závislosti na délce pulzu, např. o  $90^\circ$  ( $\pi/2$ ) do roviny



magnetické pole  $B_{\text{lok}}$ , které způsobuje stínění atomových jader od vnějšího magnetického pole  $B_0$ . Na jádra tak působí efektivní magnetické pole  $B_{\text{ef}}$  dané rozdílem vnějšího a lokálního magnetického pole:

$$B_{\text{ef}} = B_0 - B_{\text{lok}} = B_0(1 - \sigma).$$

Efektivní magnetické pole závisí na chemickém okolí jádra, které je vyjádřeno konstantou magnetického stínění  $\sigma$ . Tu ovlivňuje především výskyt  $s$  a  $p$  elektronů. Vzhledem k řádovému rozdílu mezi  $B_{\text{lok}}$  a  $B_0$  je chemický posun měřen relativně k referenčnímu signálu, např. tetramethylsilanu (TMS):

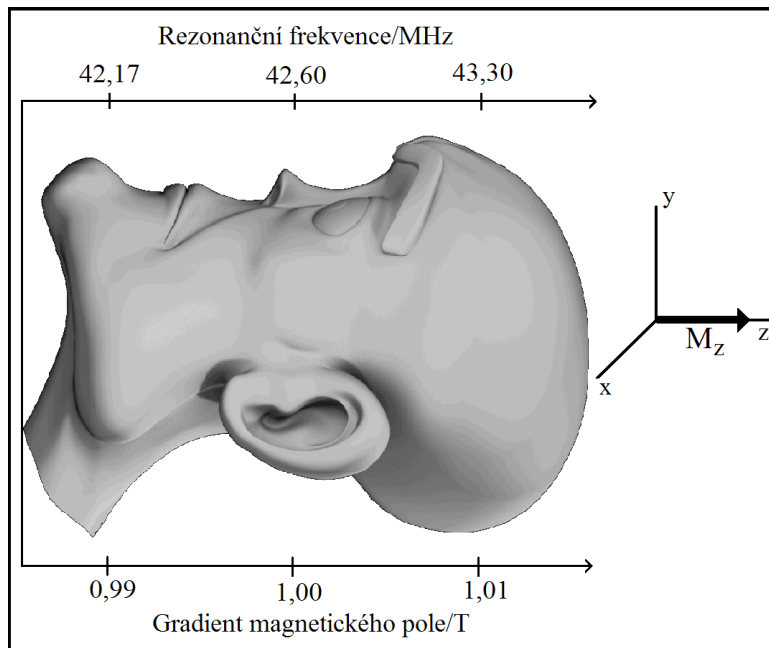
$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6 \text{ ppm}.$$

Velikost chemického posunu je nezávislá na velikosti vnějšího magnetického pole a jednotka odpovídá jedné miliontině tohoto pole<sup>[14,21]</sup>.

### 1.2.6 Tomografie vnitřních orgánů

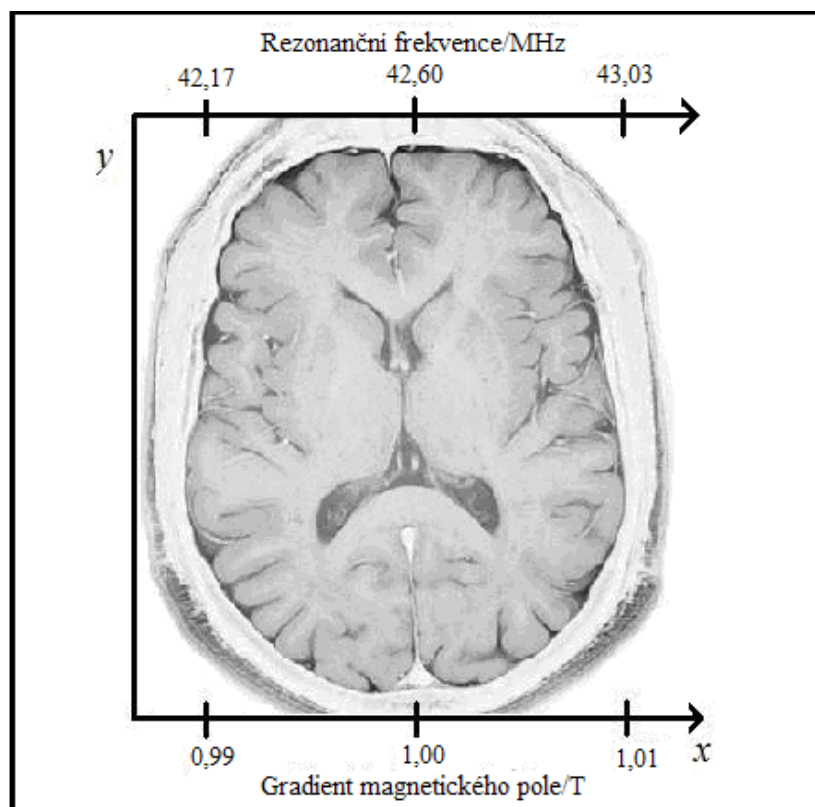
Atom vodíku tvoří dvě třetiny z celkového počtu atomů v lidském těle<sup>[22]</sup>, z čehož většina vodíkových atomů je vázána v molekule vody a v mastných kyselinách. Vzhledem k objemu vzorku při MRI je zapotřebí přesně lokalizovat místo, které má být zobrazeno. K tomuto účelu slouží gradient magnetického pole. Na rozdíl od NMR se u tomografie magnetické rezonance předpokládá, že signály atomů vodíku v molekule  $\text{H}_2\text{O}$  mají v různých tkáních v porovnání s vloženým gradientem magnetického pole zanedbatelně malou změnu chemického posunu. Pro výběr zobrazované roviny snímaného objektu je vytvořen gradient magnetického pole ve směru longitudinální magnetizace  $M_z$ . Působením určité *rezonanční frekvence* o velikosti odpovídající určité velikosti magnetického pole přijmou dostatečnou energii pro excitaci pouze atomy, které se nacházejí ve zvolené rovině (Obr. 7, str. 14)<sup>[23]</sup>.

Následným působením gradientu magnetického pole v rovině transversální  $M_{xy}$  získáme přesnou polohu signálů jednotlivých atomů a za pomoci *Fourierovy transformace* je signál převeden na obraz (Obr. 8, str. 14)<sup>[23]</sup>, na kterém jsou kontrastně oddělena místa s různou četností výskytu molekul  $\text{H}_2\text{O}$ . Kvalita kontrastu obrazů závisí především na vlastnostech zobrazované tkáně, na protonové hustotě, na velikosti vnějšího magnetického pole  $B_0$  a na relaxačních dobách  $T_1$ ,  $T_2$ , které mohou být ovlivněny kontrastními látkami.



**Obr. č. 7: Gradient magnetického pole v ose z.**

Upraveno dle: [http://www.wesgirdler.com/cartoon\\_head.html](http://www.wesgirdler.com/cartoon_head.html)



**Obr. 8: Gradient magnetického pole v rovině xy.**

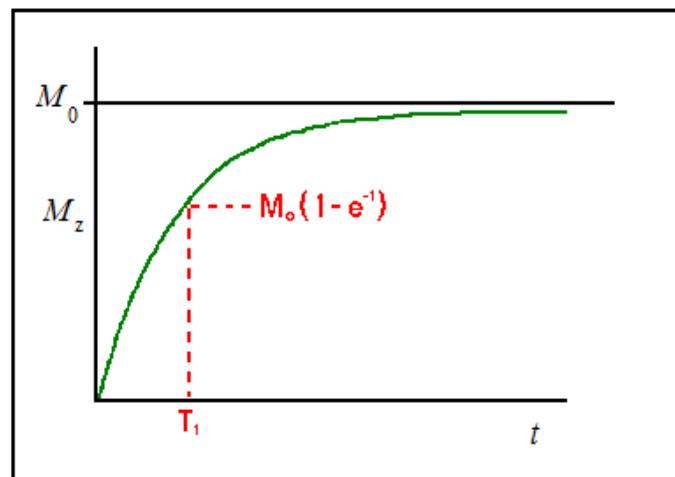
Upraveno dle: <http://images.quickblogcast.com/112346-104902/mribrain2.jpg>

### 1.2.7 Relaxace

Působením elektromagnetických pulzů na vzorek dochází k vychýlení vektoru magnetizace z rovnovážné polohy  $M_z$ . Po doznění pulzu se spinový systém vrací zpět do rovnovážného stavu, tzn. relaxuje. Doba relaxace se může pohybovat řádově od ms do několika hodin. Jsou rozlišovány dva typy relaxace (Obr. 9–11, str. 15–16), které jsou závislé např. na pH, teplotě a přítomnosti kontrastních látek. Příčná relaxace je vždy rychlejší než relaxace podélná, z důvodu náhodné interakce silových polí působící na jednotlivé spiny, které mají za následek lokální změny Larmorových frekvencí vedoucí ke ztrátě koherence. Důležitým faktem je, že se obvykle liší relaxační doba zdravé a patologické tkáně stejného typu<sup>[9,25]</sup>.

#### 1.2.7.1 Podélná (longitudinální) relaxace $T_1$

Během podélné relaxace je měřeno, jak rychle dochází k obnově magnetizace  $M_z$  ve směru osy  $z$  (Obr. 9):  $M_z = M_0 \cdot (1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$



Obr. 9: Relaxace  $T_1$ .

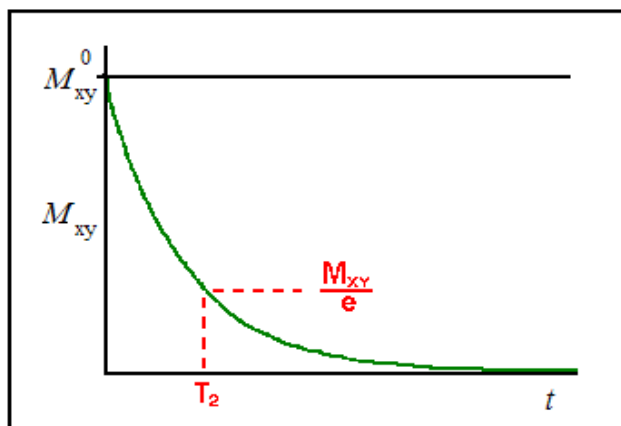
Upraveno dle: <http://mypersona.tistory.com/m/post/view/id/>

Pulzní sekvence pro měření relaxačního času  $T_1$  se skládá z pulzu  $180^\circ$ , prodlevy  $\tau$ , pulzu  $90^\circ$  a detekce signálu. Při vytváření kontrastu hraje důležitou roli čas opakování pulzní sekvence  $T_R$ . Pro zobrazení dvou oblastí s rozdílným  $T_1$  je zapotřebí zvolit čas opakování pulzu  $T_R$  tak, aby byl dostatečně krátký vzhledem k relaxaci jedné oblasti (B). Ta poté nemá dostatek času k návratu do rovnovážného stavu a poskytuje slabý signál (tmavá místa obrazu). Čas opakování musí být zároveň dostatečně dlouhý vzhledem k druhé oblasti (A), u které

dochází k obnově rovnovážného stavu a následné reexcitaci, ta poskytuje silný signál (světla místa obrazu)<sup>[9,26,27]</sup>.

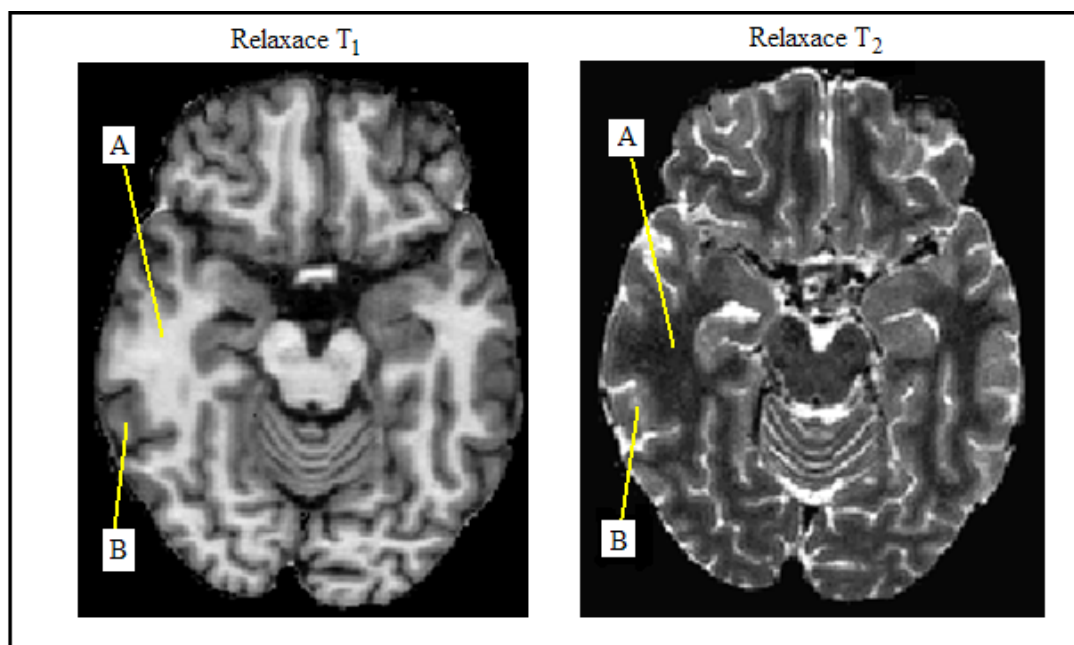
### 1.2.7.2 Příčná (transversální) relaxace $T_2$

Během příčné relaxace je měřeno, jak rychle slábne magnetizace  $M_{xy}$  ve směru roviny  $xy$  (Obr. 10):  $M_{xy} = M_{xy}^0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}$



Obr. 10: Relaxace  $T_2$ .

Upraveno dle: <http://mypersona.tistory.com/m/post/view/id/57>



Obr. 11: Srovnání relaxace  $T_1$  a  $T_2$ .

[http://www.mrforschung.med.uni-goettingen.de/engl\\_ver/mri.htm](http://www.mrforschung.med.uni-goettingen.de/engl_ver/mri.htm)

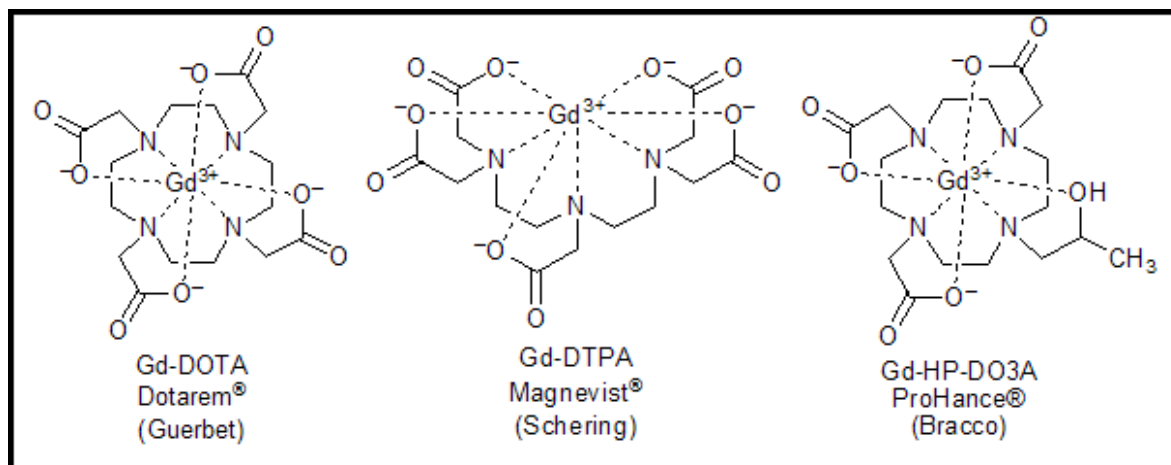


Pulzní sekvence pro měření relaxačního času  $T_2$  se skládá z pulzu  $90^\circ$ , prodlevy  $\tau$ , pulzu  $180^\circ$ , opět prodlevy  $\tau$  a detekce signálu. Při vytváření signálu hraje důležitou roli čas opakování  $T_R$  a nově čas vytvoření „spinového echa“  $T_E$ . Pro zobrazení dvou oblastí s rozdílným  $T_2$  je zvolen  $T_R$  dostatečně dlouhý, aby byla umožněna oběma oblastem podélná relaxace  $T_1$ . Čas  $T_E$  je zvolen tak, aby byl delší než podélná relaxace jedné oblasti (A), která poté dosáhne termodynamické rovnováhy dříve, než zapůsobí pulz  $180^\circ$ . Tato oblast poskytuje slabý signál (tmavá místa obrazu). Pulz  $180^\circ$  ovlivní pouze druhou oblast (B), jejíž signál je tímto pulzem převrácen v rovině  $xy$ , díky druhé prodlevě  $\tau$  zaostřen a následně detekován. Tato oblast poskytuje silný signál (světlá místa obrazu)<sup>[9,26,27]</sup>.

### 1.3 Kontrastní látky

Kontrastní látky (CA) ovlivňují relaxační čas. Na tomto základě se dělí na  $T_1$ -kontrastní látky ovlivňující především podélnou relaxaci, a na  $T_2$ -kontrastní látky ovlivňující převážně příčnou relaxaci. Většina dnes používaných kontrastních látek jsou typu  $T_1$  a poskytují pozitivní kontrast. Jedná se nejčastěji o komplexní sloučeniny Gd(III) s více vazným organickým ligandem, které zesvětlují místa svého výskytu<sup>[28]</sup>. Kontrastní látky typu  $T_2$  poskytují negativní kontrast a způsobují potemnění místa jejich pozice. Mezi  $T_2$ -kontrastní látky patří krystalické nanočástice oxidu železa<sup>[29]</sup>. Při konstrukci kontrastních látek je kladen důraz na jejich termodynamickou a kinetickou stabilitu. Vzhledem k tomu, že volný ion  $Gd^{3+}$  je značně toxický ( $LD_{50}$  0,1–0,5 mmol/kg)<sup>[30,31]</sup>, je důležité, aby ligandy měly vyšší komplexační selektivitu ke Gd(III), než k chemicky konkurenčnímu Zn(II) a Ca(II), a nedocházelo ke transmetalaci<sup>[32]</sup>.

Centrální atom gadolinia preferuje ve svých komplexech koordinační číslo 9. Je většinou vázán oktadentátním ligandem a poslední deváté koordinační místo je obsazeno molekulou vody. Účinnost kontrastních látek je charakterizována relaxivitou  $r$ <sup>[32]</sup>. Hodnota relaxivity závisí na struktuře ligandu a rovná se převrácené hodnotě času příčné nebo podélné relaxace vztažené na koncentraci kontrastní látky 1 milimol na litr (relaxivita  $r$  [ $mm^{-1}s^{-1}$ ], ref.<sup>[24,31,33]</sup>). Kontrastní látky jsou využívány u ca. 30% MRI vyšetření, převážně k diagnostice tumorů a k angiografii<sup>[24]</sup>. Mezi klinicky využívané CA patří např. Dotarem<sup>®</sup>, Bracco<sup>®</sup> nebo Magnevist<sup>®</sup> (Obr. 12, str. 18)<sup>[28]</sup>.



Obr. 12: Klinicky používané kontrastní látky.

## 2. Motivace a cíl práce

Získávání nových poznatků a vývoj stále dokonalejších, specifických kontrastních látek má velký význam pro účely klinické medicíny. Již dnes jsou u ca. 30 % vyšetření pomocí MRI používány kontrastní látky, a díky stále se rozvíjejícím technologiím se hovoří o tom, že by v budoucnu mohly např. při odstraňování tumorů provádět operace přístroje naváděné k tomu určenými kontrastními látkami.

Tato bakalářská práce si klade především následující cíle:

- Přípravu analogických komplexních sloučenin k dnes používaným  $T_1$ -kontrastním látkám záměnou centrálního atomu gadolinia za europium.
- Vypracování metodiky pro zjištění toxicity připravených látek i jejich prekurzorů na buněčných kulturách.
- Spektrofotometrické stanovení fluorescenčních vlastností připravených sloučenin.
- Vypracování metodiky pro využití fluorescenčních vlastností Eu(III) pro monitorování osudu komplexních sloučenin v buňkách.

### **3. Experimentální část**

#### **3.1 Použité chemikálie**

##### **3.1.1 Chemikálie**

Není-li uvedeno jinak, použité chemikálie pocházejí z běžných komerčních zdrojů a nebyly před použitím nijak čištěny.

Acetanhydrid

Amoniak

DOTA

Ethanolamin

H<sub>4</sub>do3ap<sup>ABn</sup> – připraveno dříve staršími kolegy v laboratoři

Hydroxid sodný

Chelaton III (disodná sůl kyseliny ethylenamintetraoctové)

Chlorid europitý hexahydrát

Chloroform

Imerzní olej

Kyselina dusičná, "suprapure"

NH<sub>4</sub>Cl

Paraformaldehyd

Per-6-amino-β-cyklohextrin – připraveno dříve staršími kolegy v laboratoři

Propylen oxid

Pyridin (bezvodý)

SAVO

*t*Bu<sub>3</sub>DO3A

Tetrachlormethan

Thiofosgen

Trifluoroctová kyselina

##### **3.1.2 Roztoky použité při práci s buňkami**

###### **Kultivační média**

Kultivační medium DMEM nebo RPMI 1640 bylo doplněno 10 % FBS; 40 μg/mL gentamycinem; 0,25 mg/mL glutaminem. Medium RPMI 1640 na rozdíl od DMEM bylo ještě suplementováno 0,05 mM β-merkapt ethanol. Sterilní příprava, skladováno při 4 °C.

### **10x PBS**

79 g NaCl; 1,1 g KCl; 29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 3,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; doplněno do 1 L destilovanou vodou, skladováno při 4 °C.

### **HBSS**

8,0 g NaCl a 0,4 g KCl bylo rozpuštěno v 90 mL destilované vody a následně doplněno do 100 mL (roztok 1), 0,358 g bezvodého Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bylo rozpuštěno v 90 mL destilované vody a následně doplněno do 100 mL (roztok 2). 0,72 g CaCl<sub>2</sub> bylo rozpuštěno v 50 mL destilované vody (roztok 3). 1,23 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 50 mL destilované vody (roztok 4). 0,35 g NaHCO<sub>3</sub> bylo rozpuštěno v 10 mL destilované vody (roztok 5). Poté byl připraven premix smícháním 10 mL roztoku 1, 1 mL roztoku 2 a 1 mL roztoku 3, doplněných do 86 mL destilovanou vodou. Poté byl přidán 1 mL roztoku 4. Bylo odebráno 9,9 mL premixu a přidáno 0,1 mL roztoku 5. Pufir byl skladován při 4 °C.

### **10x Trypsin EDTA**

5,0 g prasečího trypsinu; 2,0 g EDTA; 0,9% NaCl do 100 mL destilované vody, skladováno při -20 °C.

## **3.2 Přístroje a techniky**

### **3.2.1 Fluorescenční mikroskopie**

Pro pozorování na fluorescenčním mikroskopu IX-81 Cell-R Olympus byla buněčná kultura narostlá na krycím mikroskopickém sklíčku opláchnuta PBS a překlomena na podložní sklíčko. Na objektiv mikroskopu byla umístěna kapka imerzního oleje a poté bylo sklíčko s živými buňkami překlomeno směrem k objektivu a vloženo do mikroskopu. Při pozorování internalizace připravených komplexů do buněk bylo využito schopnosti fluorescenčního mikroskopu Cell-R vizualizovat buněčné kultury v několika režimech a schopnost vytvářet snímky i krátká videa pozorovaných kultur. Pomocí excitačního filtru DAPI350 byly komplexy europia excitovány v oblasti UV a následná emise byla sledována přes emisní filtr U-MWIGA s hranou 590 nm. Pozorování komplikovala silná vnitřní reflexe v rámci využitých optických komponent. Ta byla odstraněna po přestavění mikroskopu použitím dichroického zrcátka 400 nm a excitačního filtru 350±50 nm.

Konfokální mikroskop Leica TCS SP2 (Leica) byl využit z důvodu odstínění reflexe. Laser byl nastaven na nejkratší možnou vlnovou délku 405 nm. Tato vlnová délka je pro

pozorování komplexů europia neoptimální, vzhledem k relativně vysoké auto-fluorescenci využitých buněk se nepodařilo detekovat specifický intracelulární signál.

### 3.2.2 Centrifugace

Při přípravě  $\text{Na}_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$  a  $(\text{NH}_4)_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$  byla použita pro oddělení europitých komplexů od roztoku  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  stolní centrifuga EBA 20 (Hettich Zentrifugen,  $r = 10$  cm). Při uskladňování buněk pro elementární analýzu byla použita stolní centrifuga Minispin Plus (Eppendorf, 4500 rpm  $\approx$  1000 g, při  $r = 5$  cm) pro oddělení buněk od supernatantu.

### 3.2.3 Zjišťování počtu buněk

Mnohobarevný analyzační průtokový cytometr LSR II (Becton Dickinson) byl využit ke zjištění toxicity přidávaných komplexů. Na základě snímání rozptylu laserového paprsku byla kvantifikována buněčná suspenze v daném objemu směsi, u adherentních buněk byl vztahován počet uvolněných buněk k celkovému počtu buněk narostlých v jednotlivých jamkách.

Pro analýzu byly adherentní buňky promyty 300  $\mu\text{L}$  PBS a následně uvolněny do suspenze roztokem PBS:trypsin (5:1) o objemu 300  $\mu\text{L}$ . Pomocí mikroskopu byla určena vhodná doba pro inaktivaci trypsinu přidáním 300  $\mu\text{L}$  DMEM. Pro měření bylo použito 300  $\mu\text{L}$  vzniklého vzorku.

### 3.2.4 Stanovení obsahu europia v buňkách pomocí ICP-MS

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je analytická technika, která umožňuje stanovení velmi malých koncentrací kovů ve vzorcích v rozsahu ng/L až pg/L. ICP-MS využívá indukčně vázaného plazmatu k vytvoření iontů s nábojem právě 1+ v kombinaci s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem.

Vzorek pro ICP-MS byl připraven centrifugací buněčné kultury 3 min při 1000 g a následným resuspendováním pelety v 0,5 mL roztoku NaCl o koncentraci 0,14 M. Proces centrifugace byl ještě jednou zopakován. Promyté buňky byly opět resuspendovány, tentokrát v 0,1 mL koncentrované kyselině dusičné. Poté byly vzorky v uzavřených 1,5 mL plastových zkumavkách mineralizovány 48 hodin při 60 °C. Vzorky pro analýzu byly kvantitativně převedeny z 1,5 mL plastové zkumavky promytím 4,9 mL destilované vody do plastových zkumavek<sup>[34]</sup>. Měření obsahu europia bylo provedeno prof. Martinem Mihaljevičem

na pracovišti Ústavu geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů PřF UK na přístroji PlasmaQuad 3.

### 3.2.5 Spektrální metody

Spektrofluorometr AMINCO-Bowmann Series 2 byl využit pro naměření excitačních a emisních spekter europitých komplexů (příloha 7.1 a 7.2, str. 45, 46), na jejichž základě bylo připraveno schéma pro ideální nastavení mikroskopu (IX-81 Cell-R Olympus). Pomocí spektrofluorometru byla také provedena měření značených buněčných suspenzí B-lymfocytů, která potvrdila internalizaci komplexů do buněk (příloha 7.3, str. 47).

### 3.2.6 NMR

Nukleární magnetická rezonance je metoda, která umožňuje určení struktury měřené látky a její kvantifikaci. Na měřený vzorek v homogenním magnetickém poli působí širokofrekvenční pulz, pomocí kterého je, v závislosti na chemickém posunu, vytvořeno NMR spektrum, jehož interpretace vedla ke kontrole čistoty ligandů a komplexů. Vzorek určený pro charakterizační měření NMR spektra (10–30 mg) byl rozpuštěn v 0,45 mL D<sub>2</sub>O a převeden do NMR kyvety.

Analyzační metoda NMR-BMS slouží ke zjištění koncentrace lanthanoidů ve vodných roztocích. Paramagnetický komplex ovlivní chemický posun inertní látky (*tert*-butanolu), který je měřen oproti standardu (roztok *tert*-butanolu v insertované kyvetě) pomocí NMR spektrometru. Pro výpočet koncentrace se používá Evansova metoda<sup>[35]</sup>. Pro měření koncentrace zásobních roztoků europitých komplexů bylo ke 450 μL roztoku komplexu v NMR kyvetě přidáno 10 μL *tert*-butanolu. Do NMR kyvety byl vsunut insert (H<sub>2</sub>O/*t*BuOH) a vzorek byl změřen na NMR spektrometru.

Spektra byla naměřena na spektrometru Varian VNMR5300, měření provedli Dr. Bohuslav Drahoš a Dr. Jan Plutnar.

### **3.3 Práce s buněčnými kulturami**

#### **3.3.1 Buněčné linie**

(Všechny ATCC, dar prof. Václava Hořejšího, ÚMG AV ČR)

##### **HeLa**

Lidská linie původem z adenokarcinomu děložního krčku, adherentní, epiteloidní morfologie.

##### **Fibroblasty**

Primární lidská buněčná linie, původem z kožního epitelu, adherentní, typická fibroblastoidní morfologie.

##### **K71**

Myší linie B-lymfocyt Myší imortalizovaná linie B-lymfocytů, suspenzní, schopná signalizovat prostřednictvím povrchového imunoglobulinu i MHC II. třídy.

#### **3.3.2 Kultivace**

Buňky HeLa i fibroblasty byly kultivovány v plastiku určeném pro tkáňové kultury (NUnc), v živném mediu DMEM, v inkubátoru, při teplotě 37 °C a 5 % obsahu CO<sub>2</sub>, pasážovány dle potřeby 2–3x týdně. Buňky K71 byly kultivovány v RPMI.

#### **3.3.3 Pasážování buněk**

Pomocí Pasteurovy pipety bylo odebráno živné medium a buňky byly opláchnuty 2x5 min PBS (cca 250 µl). Adherentní buňky byly překryty roztokem PBS:trypsin v poměru 5:1. Pomocí mikroskopu byla určena dostatečná doba působení enzymu a k buňkám bylo při pozorovaném dostatečném uvolnění buněčné suspence přidáno DMEM obsahující hovězí sérum odpovídající množství PBS:trypsin v poměru 1:1. Pro další kultivaci byla v lahvičce ponechána 1/10 populace. Pasážované buňky byly použity k analýze nebo byly usmrceny v 10 % roztoku SAVA.

#### **3.3.4 Fixace**

Sklička s buňkami byla opláchnuta roztokem PBS vyhřátým na 37 °C. Poté byla fixována 20 minut při teplotě 37 °C ve 4 % (w/v) roztoku formaldehydu v PBS. Následně



byla sklíčka promyta 2x5 minut v PBS. Dále byl přidán 15 mM NH<sub>4</sub>Cl pro detoxikaci zbylého formaldehydu (5 minut). Následně byla sklíčka 3x propláchnuta roztokem PBS a ihned použita k fluorescenční mikroskopii.

### **3.3.5 Internalizace komplexů**

Roztoky europitých komplexů (o objemu 10, 20, 30, 40, 50 μL) byly přidávány přímo do media k buňkám kultivovaným v 6- či 24- jamkových destičkách v mediu o objemu 1 mL.

### 3.4 Syntetická část

#### 3.4.1 Syntéza $\text{Na}_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$

Hexahydrát chloridu europitého (0,980 g, 2,67 mmol, 1,05 ekv. k  $\text{H}_5\text{dtpa}$ ) byl rozpuštěn ve 20 mL destilované vody. K tomuto roztoku byl za míchání přikapán roztok NaOH (0,36 g, 3,5 ekv. k  $\text{H}_5\text{dtpa}$ ) v 5 mL vody. Vyloučený  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  byl oddělen centrifugací, supernatant odstraněn pomocí Pasteurovy pipety, a produkt byl resuspendován v 10 mL destilované vody a znovu oddělen centrifugací. Celá procedura byla ještě jednou zopakována. K promytému  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  byla přidána  $\text{H}_5\text{dtpa}$  (1,00 g, 2,54 mmol) a cca 10 mL vody. Takto připravená směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 48 h. Poté bylo pH směsi upraveno přidavkem roztoku NaOH (~3–4 mL 5% roztoku) na hodnotu 7–8 (kontrola pH papírkem) a směs byla filtrována přes skládaný filtrační papír. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce, a komplex byl (pomocí injekční stříkačky za současné filtrace přes mikrobiální filtr) převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 10 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{vzorek}) = 4,24 \text{ ppm}$ , odpovídá koncentraci  $c = 144 \text{ mM}$ .

#### 3.4.2 Syntéza $(\text{NH}_4)_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$

Hexahydrát chloridu europitého (0,980 g, 2,67 mmol) byl rozpuštěn ve 20 mL destilované vody. Přidáváním 5% roztoku  $\text{NH}_4\text{OH}$  bylo upraveno pH na hodnotu 9. Vyloučený  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  byl oddělen centrifugací, supernatant odstraněn pomocí Pasteurovy pipety, a produkt byl resuspendován v 10 mL destilované vody a znovu oddělen centrifugací. Celá procedura byla zopakována ještě jednou. K promytému  $\text{Eu}(\text{OH})_3$  byla přidána  $\text{H}_5\text{dtpa}$  (1,00 g, 2,54 mmol) a cca 10 mL destilované vody. Takto připravená směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 48 h. Poté bylo pH směsi upraveno přidavkem 5% roztoku  $\text{NH}_4\text{OH}$  (~3–4 mL 5% roztoku) na hodnotu 7–8 (kontrola pH papírkem) a směs byla filtrována přes skládaný filtrační papír. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce, a komplex byl (pomocí injekční stříkačky za současné filtrace přes mikrobiální filtr) převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 10 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{vzorek}) = 4,84 \text{ ppm}$ , odpovídá koncentraci  $c = 173 \text{ mM}$ .

$^1\text{H}$  NMR: 300  $\mu\text{L}$  zásobního roztoku bylo odpařeno dosucha na vakuové odparce, a odparek byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$ .  $\delta = -15,80$  (1H);  $-14,59$  (1H);  $-11,89$  (4H);  $-9,10$  (1H);  $-6,33$

(1H); -4,90 (1H); -2,62 (1H); -1,62 (1H); 5,23 (2H); 7,39 (2H); 12,28 (1H); 23,76 (1H); 29,44 (1H); ve spektru nebyly detekovány signály příslušející volnému ligandu.

### 3.4.3 Syntéza $\text{NH}_4[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dota})]$

Navážka  $\text{H}_4\text{dota}$  (1,14 g, 2,59 mmol) byla rozpuštěna v 35 mL destilované vody. K roztoku byl po částech přidán hexahydrát chloridu europitého (1,00 g, 2,73 mmol) a poté ještě po částech 0,44 g NaOH rozpuštěného ve 4 mL destilované vody. Takto připravená směs byla ponechána míchat při teplotě 80 °C po dobu 24 hodin. Sloupcovou chromatografií byly promytím silikagelu fází líc:amoniak (10:1) o objemu 250 mL jímány tři frakce a poté promytím roztokem líc:amoniak (1:1) o objemu 250 mL další tři frakce. Pomocí luminiscenčního spektrometru byla určena frakce s nejvyšším obsahem komplexu. Tato frakce byla filtrována přes skládaný filtr a následně ultrafiltrována (přes membránu s velikostí pórů 500 Da). Obsah ultrafiltrační cely byl odpařen do sucha na vakuové odparce a komplex byl kvantitativně (pomocí injekční stříkačky za současné filtrace přes mikrobiální filtr) převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 10 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25$  ppm,  $\delta(\text{vzorek}) = 2,38$  ppm, odpovídá koncentraci  $c = 55$  mM.

$^1\text{H}$  NMR: 300  $\mu\text{L}$  zásobního roztoku bylo odpařeno dosucha na vakuové odparce, a odparek byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$ . Zkřížený-antiprizmatický diastereoizomer (TSA):  $\delta = -15,72$  (4H); -14,33 (4H); -7,75 (4H); -6,52 (4H); -0,90 (4H); 33,81 (4H). Čtvercově-antiprizmatický diastereoizomer (SA):  $\delta = -9,26$  (4H); -7,01 (4H); -4,03 (4H); -1,89 (4H); -0,88 (4H); 13,48 (4H). Poměr TSA:SA 80:20. Ve spektru nebyly detekovány signály příslušející volnému ligandu.

### 3.4.4 Syntéza bis(2-hydroxyethylamidu) diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA-BA)

K navážce  $\text{H}_5\text{dtpa}$  (1,00 g 2,54 mmol) byl přidán anhydrid kyseliny octové (1,2 mL, 12,6 mmol) a poté bezvodý pyridin (1,3 mL, 16 mmol). Směs byla ponechána míchat 48 hodin při teplotě 65 °C a poté filtrována přes fritu. Produkt Bis(anhydrid) DTPA byl následně uskladněn v exsikátoru.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,71$  (s, 8H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 3,66 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 3,07 (t, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2,91 (t, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 51,65$  (2C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 52,49 (2C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 54,59 (1C,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ); 54,91 (1C,  $\text{NCH}_2\text{CO}$ ); 165,80 (1C, CO); 172,57 (4C, CO).

Bis(anhydrid) DTPA (0,75 g, 2,1 mmol) byl po částech přidán do roztoku ethanolaminu (1,45 mL, 24,2 mmol) v 6 mL destilované vody. Po 24 hodinách byl vzniklý DTPA-EA odpařen na vakuové odparce a charakterizován NMR spektroskopií.  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 2,79$  (4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2,84 (4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 2,87 (4H,  $\text{NHCH}_2$ ); 3,21 (4H,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ); 3,29 (2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 3,30 (4H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 3,38 (4H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ).  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 178,71$  (2C,  $\text{COOH}$ ); 176,52 (1C,  $\text{COOH}$ ); 174,20 (2C,  $\text{CONH}$ ); 59,45 (2C,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 58,55 (2C,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 58,11 (2C,  $\text{NCH}_2\text{CONH}$ ); 56,64 (1C,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 51,61 (2C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 51,46 (2C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ); 40,66 (2C,  $\text{CONHCH}_2$ ).

#### 3.4.5 Syntéza $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$

Surový DTPA-EA byl komplexován s hexahydrátem chloridu europitého (2,54 mmol, 0,89 g) ve 35 mL destilované vody. Prostředí komplexace bylo upraveno přidávkem 5 mL hydroxidu sodného o koncentraci 1,5 M. Vzniklý roztok byl míchán za laboratorní teploty po dobu 24 hodin, poté filtrován přes mikrobiální filtr a následně ultrafiltrován (přes membránu s velikostí pórů 500 Da). Obsah ultrafiltrační cely byl odpařen na vakuové odparce a vzorek charakterizován NMR-BMS. Komplex byl převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 10 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25$  ppm,  $\delta(\text{vzorek}) = 4,17$  ppm, odpovídá koncentraci  $c = 141$  mM.

#### 3.4.6 Syntéza 10-hydroxypropyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny (DO3A-HP)

K  $t\text{Bu}_3\text{DO3A}$  (1,00 g, 1,68 mmol) rozpuštěnému v 10 mL chloroformu byl přidán propylenoxid (0,35 mL, 5,04 mmol). Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Poté bylo přidáno 7 mL trifluoroctové kyseliny a 7 mL chloroformu a směs byla opět ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. DO3A-HP byl izolován odpařením vedlejších produktů ve vakuové odparce. Poté byl ligand rozpuštěn ve 12 mL kyseliny chlorovodíkové a odpařen na vakuové odparce. Následně byl tento proces proveden ještě dvakrát s 15 mL destilované vody.

#### 3.4.7 Syntéza $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$

K DO3A-HP rozpuštěné v 8,4 mL destilované vody byl přidán hexahydrát chloridu europitého (0,55 g, 1,5 mmol) a pevný NaOH (0,34 g, 8,5 mmol). Směs byla míchána

za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Vzniklý komplex byl filtrován přes skládaný filtr a následně ultrafiltrován (přes membránu s velikostí pórů 500 Da). Obsah ultrafiltrační cely byl odpařen do sucha na vakuové odparce a komplex byl kvantitativně (pomocí injekční stříkačky za současné filtrace přes mikrobiální filtr) převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 10 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{vzorek}) = 3,91 \text{ ppm}$ , odpovídá koncentraci  $c = 128 \text{ mM}$ .

$^1\text{H NMR}$ : 300  $\mu\text{L}$  zásobního roztoku bylo odpařeno dosucha na vakuové odparce, a odparek byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$ .  $\delta = -16,72; -15,45; -10,95; -10,24; -8,62; -6,85; -5,16; -4,39; -2,96; -2,43; 5,23; 6,22$ ; ve spektru nebyly detekovány signály příslušející volnému ligandu.

#### **3.4.8 Syntéza 10-[[4-izothiokyanatobenzyl](hydroxy)fosforyl]methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové kyseliny**

K  $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$  (2,99 g, 3,8 mmol) rozpuštěné v 5 mL vody bylo přidáno 5 mL tetrachlormetanu a 0,9 mL thiofosgenu. Směs byla ponechána zprudka míchat za laboratorní teploty, při pH 1, po dobu 24 hodin. Po sedimentaci roztoku byla odebrána dolní (organická) fáze a horní vodná část směsi byla odpařena na vakuové odparce.

#### **3.4.9 Konjugace $\text{DO3AP}^{\text{NCS}}$ s per-6-amino- $\beta$ -cyklodextrinem, příprava $\text{L}_7\text{-}\beta\text{-CD}$**

Per-6-amino- $\beta$ -cyklodextrin (0,56 g, 0,36 mmol) byl rozpuštěn v 10 mL destilované vody a pH tohoto roztoku bylo upraveno pomocí 5 % roztoku NaOH na hodnotu 8. Poté byla do roztoku po částech přidávána  $\text{DO3AP}^{\text{NCS}}$  rozpuštěná v 10 mL destilované vody za stálého udržování pH na hodnotě 8. Po přidání veškeré  $\text{DO3AP}^{\text{NCS}}$  byl roztok ponechán míchat při teplotě 45 °C po dobu 24 hodin. Vzniklý roztok  $\text{L}_7\text{-}\beta\text{-CD}$  filtrován přes filtrační papír a následně ultrafiltrován (přes membránu s velikostí pórů 3000 Da). Filtrát byl odpařen na vakuové odparce.

#### **3.4.10 Syntéza $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$**

$\text{L}_7\text{-}\beta\text{-CD}$  byl rozpuštěn v 10 mL destilované vody. Po přidavku chloridu europitého (0,70 g, 1,91 mmol) bylo pH upraveno na hodnotu 8 pomocí 10% roztoku NaOH. Roztok byl naředěn 20 mL destilované vody a ponechán míchat za laboratorní teploty po dobu 12 hodin. Chelaton III (0,71 g, 1,91 mmol) rozpuštěný v 5 mL destilované vody byl postupně přidáván ke kalnému roztoku  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$ , dokud se roztok nestal čirý. Poté byla provedena filtrace přes filtrační papír a následně ultrafiltrace (přes membránu s velikostí pórů 3000 Da). Obsah

ultrafiltrační cely byl odpařen do sucha na vakuové odparce a komplex byl kvantitativně (pomocí injekční stříkačky za současné filtrace přes mikrobiální filtr) převeden do zásobní kalibrované zkumavky a naředěn na 9,4 mL.

Koncentrace tohoto zásobního roztoku byla stanovena pomocí metody BMS.  $\delta(\text{standard}) = 1,25 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{vzorek}) = 3,91 \text{ ppm}$ , odpovídá koncentraci  $c = 179 \text{ mM}$ .

$^1\text{H NMR}$ : 300  $\mu\text{L}$  zásobního roztoku bylo odpařeno dosucha na vakuové odparce, a odparek byl rozpuštěn v  $\text{D}_2\text{O}$ .  $\delta = -18,15$  až  $5,96$  (řada multipletů);  $-10,73$ ,  $12,87$ ,  $17,73$  a  $22,05$  ( $\text{H}_{\text{ax}}$  diastereoizomeru SA);  $27,47$ ,  $33,46$ ,  $36,32$  a  $38,06$  ( $\text{H}_{\text{ax}}$  diastereoizomeru TSA). Ve spektru nebyly detekovány signály příslušející volnému ligandu.

## 4. Výsledky a diskuze

Přesné koncentrace zásobních roztoků europitých komplexů byly stanoveny pomocí analytické metody NMR-BMS. Alikvotní objemy zásobních roztoků (o objemech 10, 20, 30, 40 a 50  $\mu\text{L}$ ) byly přidávány k buněčným kulturám kultivovaných v 1 mL media. V jednotlivých případech byla zjištěna viabilita (spočítání buněk pomocí FACS) a následně byl zjištěn obsah europia v buňkách (pomocí ICP-MS). Pro interpretaci výsledků byly sestrojeny grafy zobrazující procentuální viabilitu buněk ovlivněnou přítomností europitých komplexů. Pro interpretaci internalizace byly do grafu vyneseny údaje o zastoupení europia připadající na jednu buňku.

### 4.1 Koncentrace zásobních roztoků

Koncentrace zásobních roztoků europitých komplexů byly vypočítány Evansovou metodou<sup>[35]</sup> pomocí NMR-BMS (Tabulka 2).

**Tabulka 2: Koncentrace europitých komplexů stanovená pomocí NMR-BMS.**

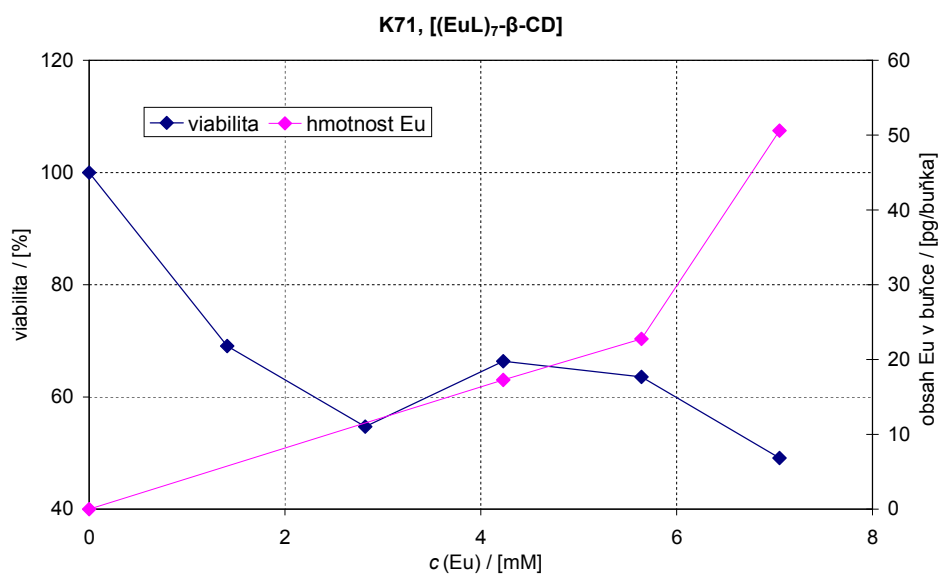
Látka	Koncentrace $c/[\text{mM}]$
$\text{Na}_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$	144
$(\text{NH}_4)_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$	173
$[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$	141
$\text{NH}_4[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dota})]$	54
$[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$	128
$[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$	179

Příprava všech roztoků komplexních sloučenin byla teoreticky vypočítána na 200 mM. V případě  $\text{NH}_4[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dota})]$  došlo ke značným ztrátám produktu během chromatografické separace a následné ultrafiltrace, při přípravě  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$  a  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$  byla kritickým krokem syntézy ultrafiltrační separace přes membránu s velikostí póru 500 Da, kdy docházelo k největšímu poklesu koncentrace produktu. Při ultrafiltraci  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$  přes membránu s velikostí póru 3000 Da, byly ztráty na produktu velmi malé. Příprava  $\text{Na}_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$  a  $(\text{NH}_4)_2[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa})]$  byla závislá na vhodné hodnotě pH určující kvalitu komplexačního kroku reakce. Určitá ztráta mohla vzniknout i při oddělování hydroxidu europitého centrifugací.

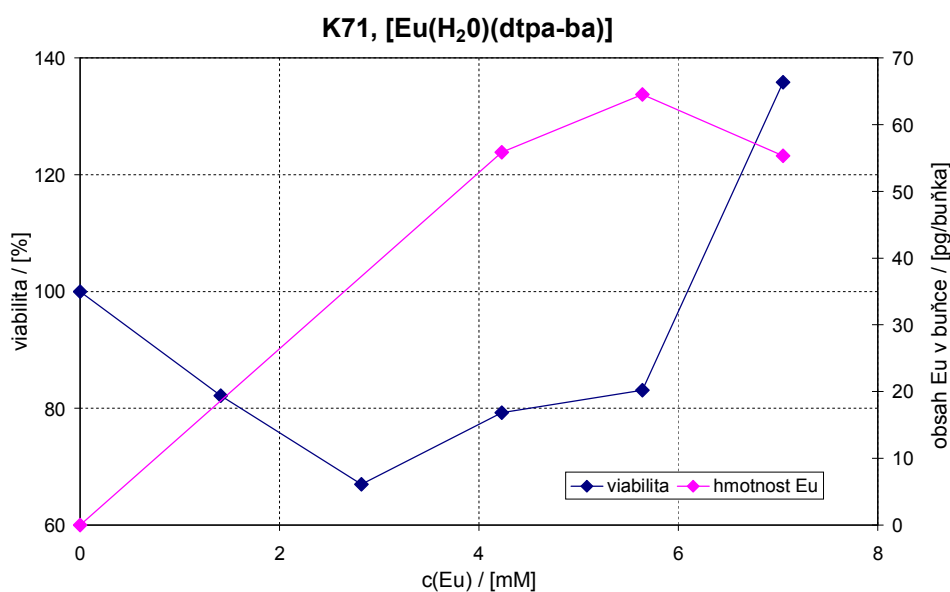
## 4.2 Internalizace europitých komplexů

### 4.2.1 K71 (myší linie B-lymfocytů)

B-lymfocyty díky své endocytické a pinocytické aktivitě pohlcovaly přidávané komplexy ve výrazně vyšší míře než zbylé dva použité typy buněk. V případě  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$  přijímaly B-lymfocyty okolo 50 pg europia na jednu buňku bez projevu zvýšené mortality. Nízká toxicita DTPA-BA i  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$  dokazuje termodynamickou a kinetickou stabilitu těchto komplexů (graf 1 a graf 2).



Graf 1: Internalizace  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$  do B-lymfocytů.



Graf 2: Internalizace  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$  do B-lymfocytů.



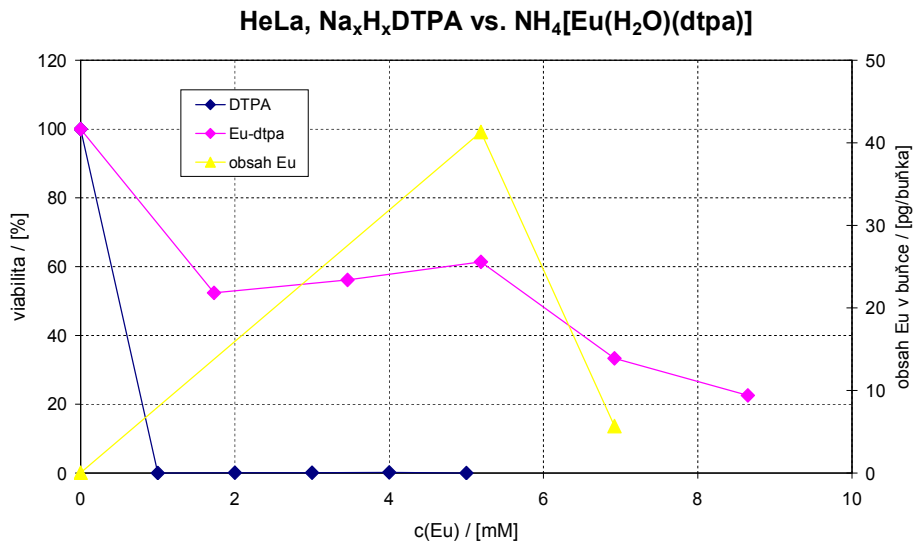
Při odebírání vzorků pro měření počtu buněk pomocí FACS i při přípravě vzorků pro ICP-MS vznikalo riziko nerovnoměrné distribuce buněk, které může mít za následek chybnou interpretaci účinku toxicity europitých komplexů na viabilitu. Při shromažďování dat byl nejprve odebírán vzorek pro stanovení toxicity. Pokud byla při jeho odběru odebrána většina ze všech buněk kultivovaných v dané jamce (vzhledem k sedimentaci buněk během odběrů), může viabilita nabývat hodnot převyšující počet buněk i v negativní kontrole, tedy 100%. V případě, že by došlo k takovéto nepřesnosti, projevil by se tento fakt nízkým obsahem europia v buňkách, stanoveným elementární analýzou (ICP-MS), který by neodpovídal trendu závislosti koncentrace na počtu buněk, což se též stalo, viz nejvyšší koncentrace v grafu 2 (str. 32).

#### **4.2.2 HeLa buňky**

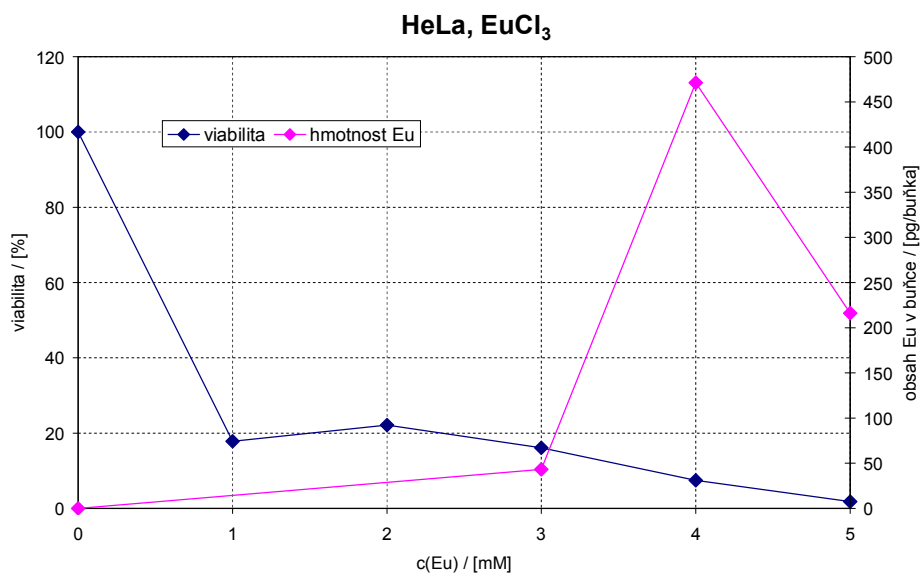
HeLa buňky tvoří přisedlé kolonie, a proto přijímají menší množství okolního média a tedy i europitých komplexů, než suspenzní B-lymfocyty.

U HeLa buněk byla testována toxicita reaktantů DTPA a  $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  používaných při syntéze komplexů. Bylo zjištěno, že toxicita volného ligandu DTPA je obrovská. Již při nízkých koncentracích způsobuje smrt téměř celé populace. Pokud je však DTPA koordinována, tak její toxicita významně klesá (graf 3, str. 34). Roztok volné DTPA nejspíše koordinuje vápenaté ionty a tím významně ovlivňuje životaschopnost organismů.

Toxicita trojmocného kationtu europia je menší než DTPA, ale rovněž značná, jak ukazuje graf 4 na str. 34. Vysoké hodnoty pro přítomnost Eu v buňkách mohou být způsobeny zvýšenou permeabilitou nekrotických/apoptotických buněk, která má za následek nespecifický pasivní uptake komplexu.

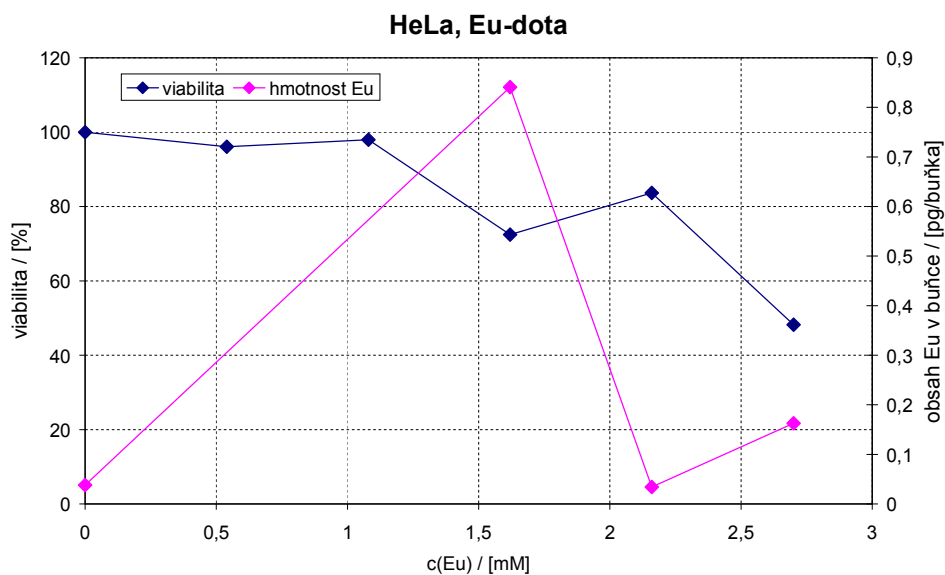


**Graf 3: Toxicita volného a vázaného ligandu DTPA.**



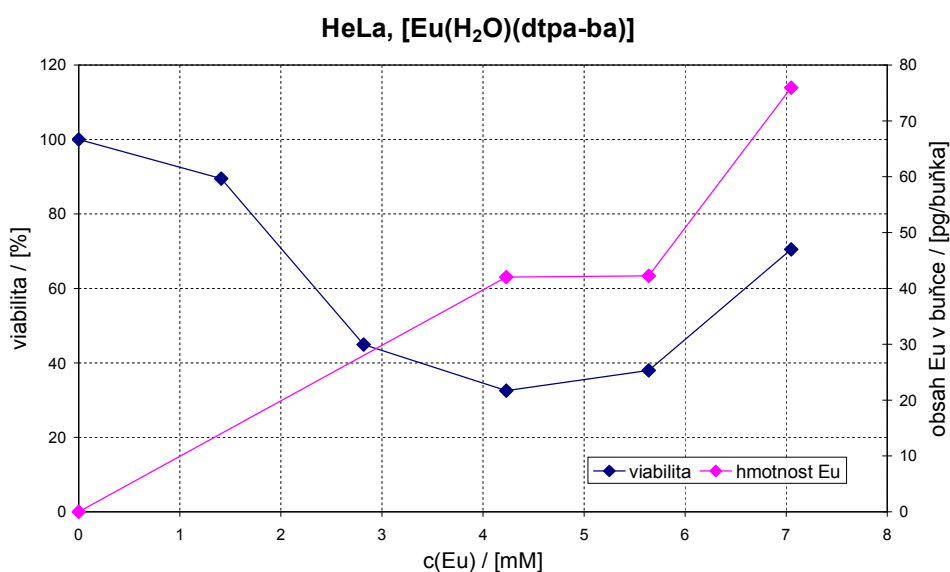
**Graf 4: Internalizace  $\text{EuCl}_3$  do HeLa buněk.**

Zdá se, že komplex s makrocyclickým ligandem DOTA je v porovnání s volnými substráty i ostatními komplexy toxický velmi málo (graf 5, str 35; toto tvrzení není bohužel zcela průkazné kvůli nižší koncentraci tohoto komplexu v zásobním roztoku). Je ale obecně známo, že stabilita tohoto komplexu je vysoká díky makrocyclickému efektu. Údaje o obsahu europia jsou bohužel zkreslené blíže neidentifikovatelnou chybou.



**Graf 5: Internalizace NH<sub>4</sub>[Eu(H<sub>2</sub>O)(dota)] do HeLa buněk.**

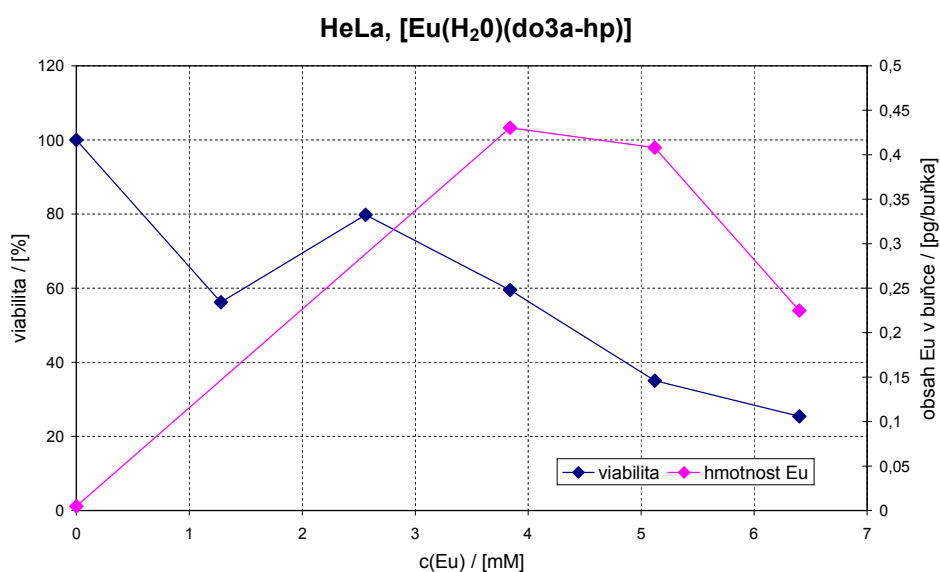
Komplex [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)], jehož ligandem je bis(amid) DTPA, vykazoval mnohem nižší toxicitu než (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa)] (graf 6). Toto zjištění je překvapivé, protože neutrální komplexy DTPA-bis(amidů) s lanthanoidy jsou za podmínek *in vivo* obvykle méně stálé a tedy i více toxické než komplexy DTPA<sup>[28]</sup>. V našem experimentu však zřejmě nedokonalou přípravou europitého komplexu s DTPA zůstaly v zásobním roztoku stopy volného ligandu, a proto vykazuje (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa)] větší toxicitu než [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)]. Zároveň neutrální komplex [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)] velmi dobře internalizuje do buněk.



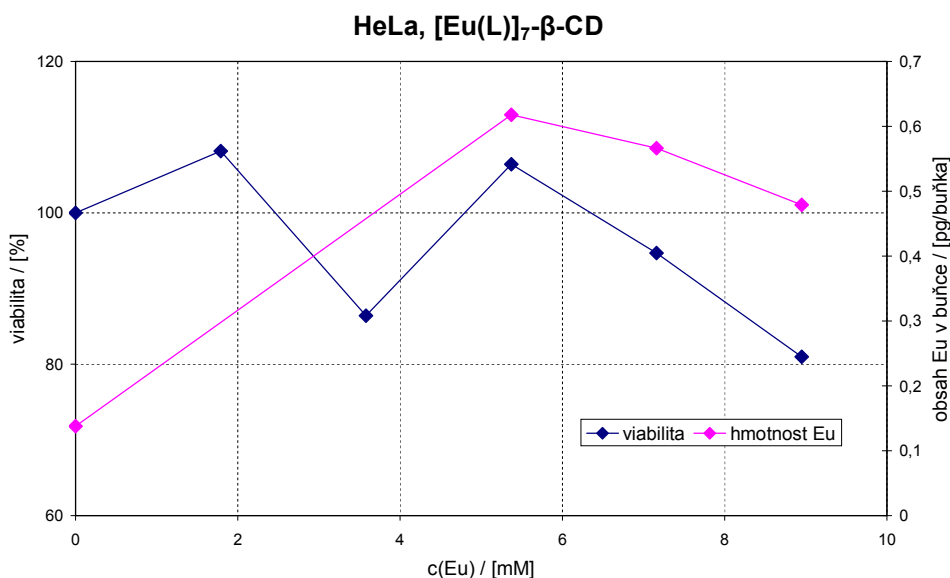
**Graf 6: Internalizace [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)] do HeLa buněk.**

Substitucí acetátového pendantního ramene v molekule DOTA za 2-hydroxypropyl byl získán další ligand a jeho komplex  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$ , jehož toxicita porušením symetrie původního ligandu mírně vzrostla, i přes to nebyla nijak značná (graf 7). Překvapivě, přestože se jedná o nenabíý komplex, podobně jako je  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$ , tak jeho internalizace do buněk je velmi malá.

Nejobjemnějším testovaným komplexem byl  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$ , který neměl téměř žádné toxické účinky, ale zřejmě kvůli své velikosti nebyl do HeLa buněk internalizován ve velké koncentraci (graf 8).



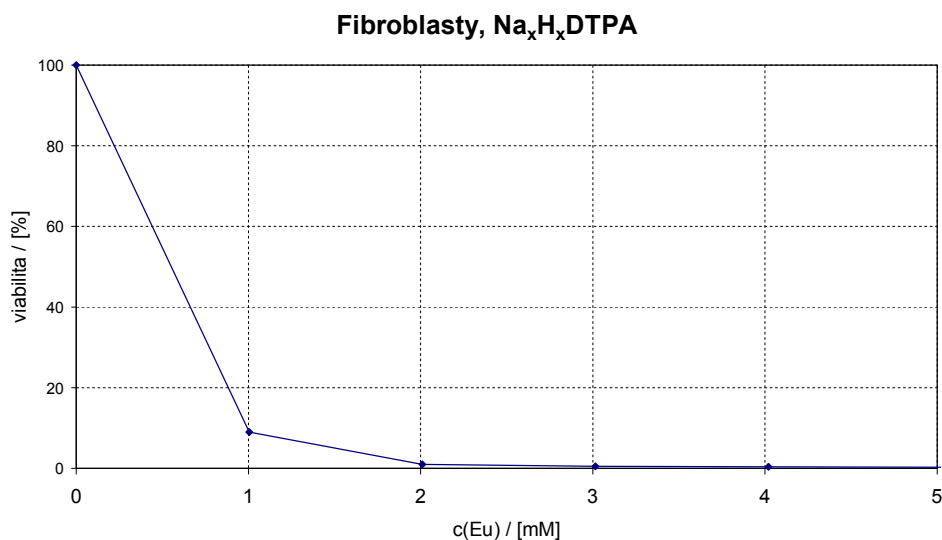
**Graf 7: Internalizace  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$  do HeLa buněk.**



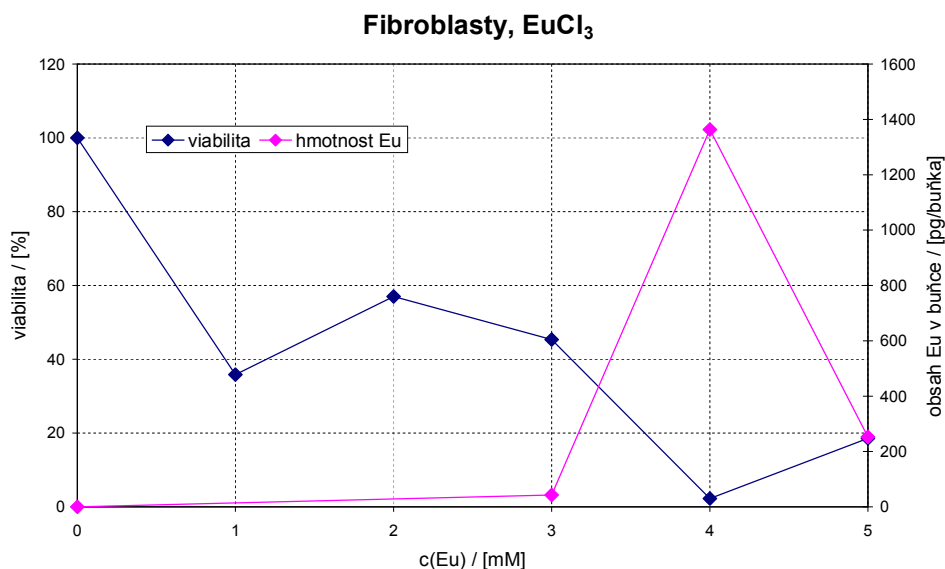
**Graf 8: Internalizace  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$ .**

### 4.2.3 Fibroblasty

Fibroblasty kožního epitelu měly velmi podobné reakce na všechny testované sloučeniny jako HeLa buňky. Toxicita volného ligandu DTPA byla pro buňky fibroblastů extrémně vysoká (graf 9), naopak roztok europitých kationtů byl přijat fibroblasty lépe než HeLa buňkami (graf 10).



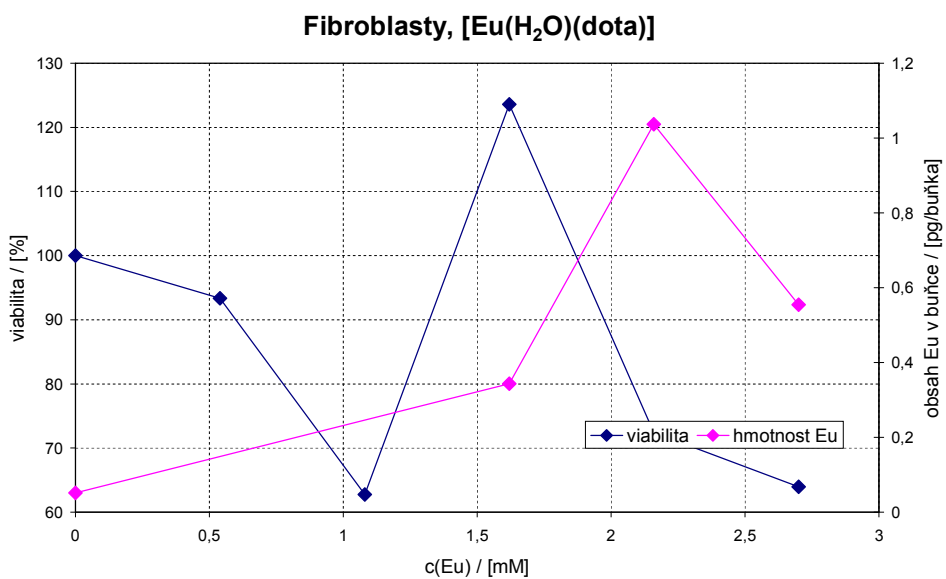
**Graf 9: Toxicita DTPA vůči fibroblastům.**



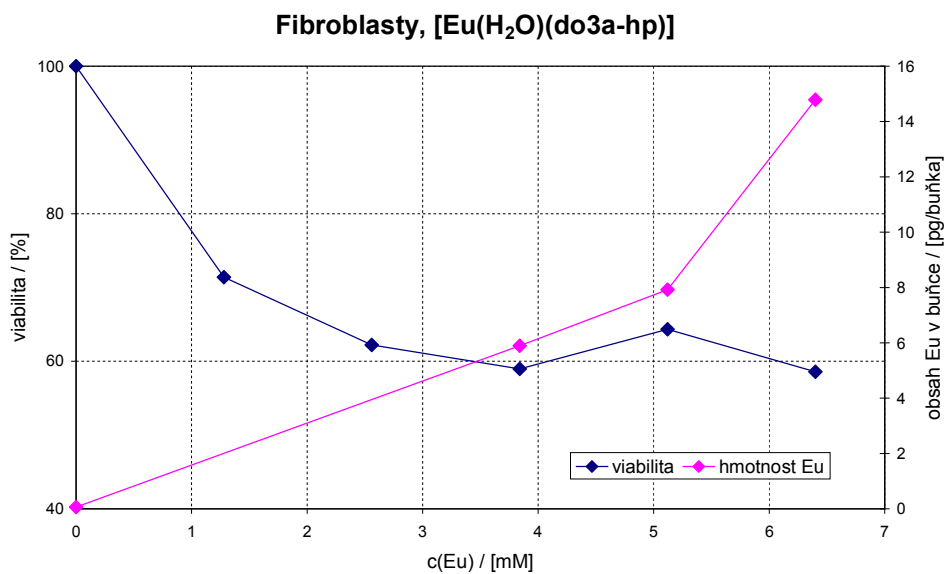
**Graf 10: Internalizace  $\text{EuCl}_3$  do buněk fibroblastů.**

Fibroblasty téměř u všech makrocyclických komplexních sloučenin vykazovaly malou míru internalizace, což se projevilo zdánlivě nízkými toxickými účinky těchto komplexů a

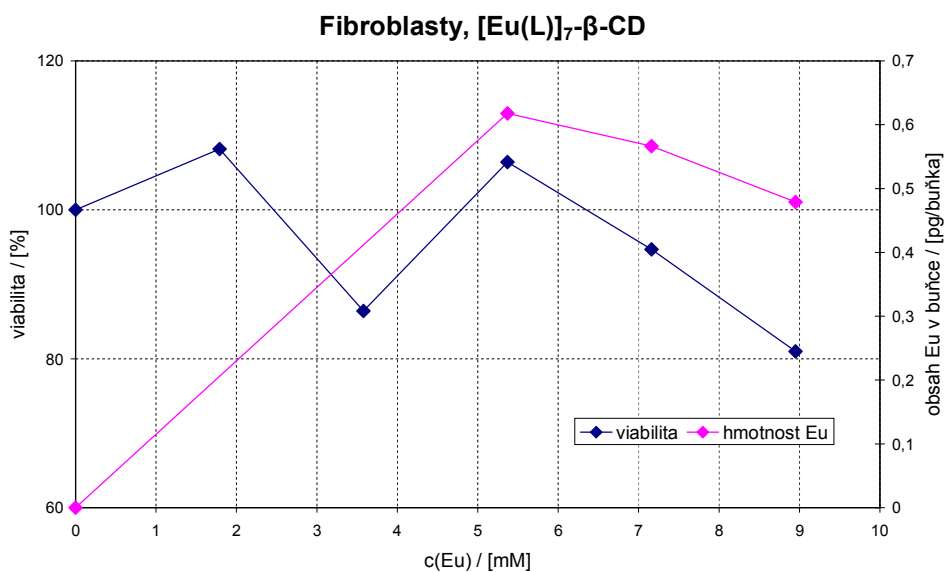
rovněž velmi malými obsahy europia (grafy 11–13, str. 38,39). Nejvyšší míru internalizace z makrocyclických sloučenin vykázal neutrální derivát  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$



**Graf 11: Internalizace  $\text{NH}_4[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dota})]$  do buněk fibroblastů.**

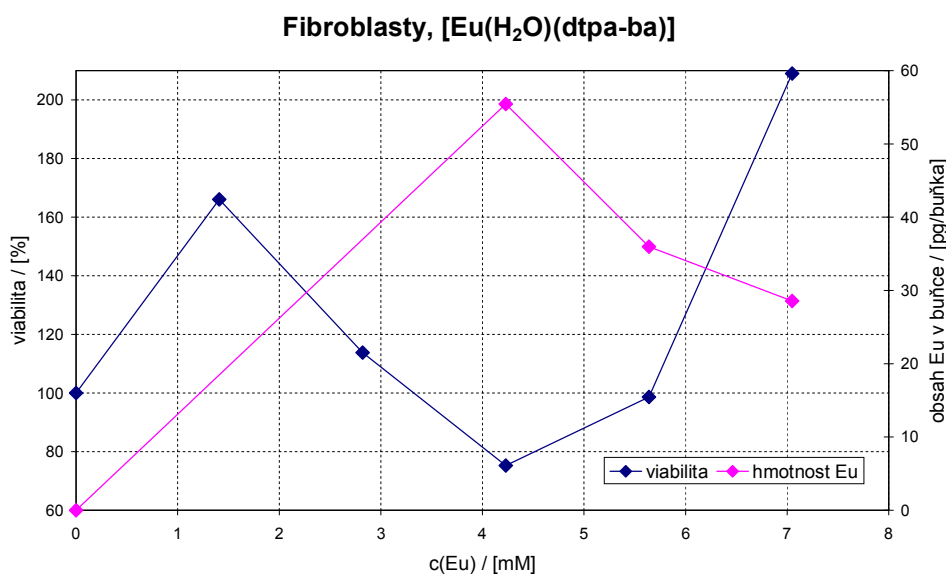


**Graf 12: Internalizace  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$  do buněk fibroblastů.**



**Graf 13: Internalizace [Eu(L)]<sub>7</sub>-β-CD do buněk fibroblastů.**

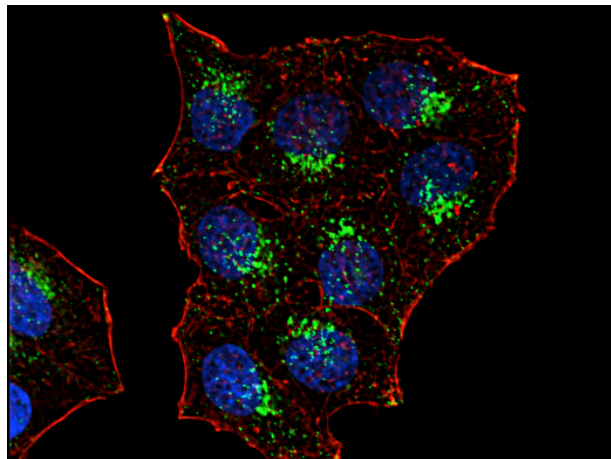
Komplex, který dokázal nejučinněji přestupovat přes cytoplasmatickou membránu fibroblastů, byl [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)]. Tento komplex měl minimální toxické účinky s ohledem na množství vstřebané látky buňkami (graf 14).



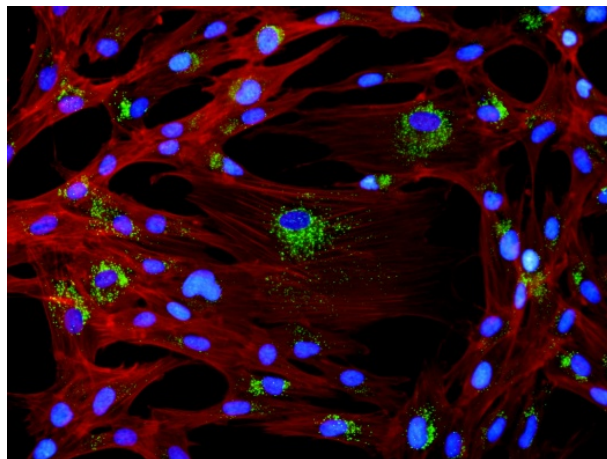
**Graf 14: Internalizace [Eu(H<sub>2</sub>O)(dtpa-ba)] do buněk fibroblastů.**

### 4.3 Mikroskopie

Pro pozorování buněk byl použit fluorescenční mikroskop IX-81 Cell-R Olympus. Pomocí excitačního filtru DAPI350 ( $350\pm 50$  nm) byly komplexy europia excitovány v oblasti UV a následná emise byla sledována přes emisní filtr U-MWIGA s hranou 590 nm. Byly pozorovány adherentní buněčné kultury HeLa buněk (Obr. 13) a fibroblastů (Obr. 14).



**Obr. 13: HeLa buňky**



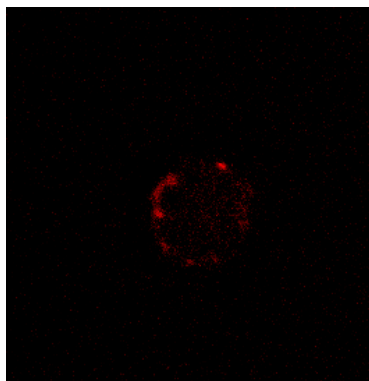
**Obr. 14: Fibroblasty**

Modře – buněčná jádra, vizualizace s DAPI; Červeně – aktin, vizualizace s Faloidin Alexa 594; Zeleně – lysosomy, vizualizace s LAMP 3. Rozměr fotografie  $40\times 30\ \mu\text{m}$ , zvětšení objektivu 60x, konfokální mikroskop Leica TCS SP2. Zdroj: doc. RNDr. J. Černý.

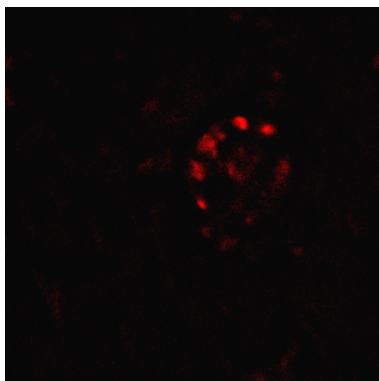
K buněčným kulturám byly přidávány europité komplexy o různých koncentracích (objemy přidávaných roztoků byly 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{L}$ ). Následně byl s různou časovou prodlevou (0, 24, 48, 72 hodin) zkoumán fluorescenční signál komplexů internalizovaných do buněk. HeLa buňky vykazovaly při zvoleném nastavení celkem značnou autofluorescenci (Obr. 15, str. 40).

Na HeLa buňkách byla pozorována fluorescence prokazující úspěšnou internalizaci komplexů do buněk prokazatelněji než u fibroblastů. Nejlepší snímky byly pořízeny po 24 hodinové inkubaci buněk s 50  $\mu\text{L}$  zásobního roztoku  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$  odpovídající koncentraci 6,4 mM na 1 mL media (Obr. 16, str. 41), a s 50  $\mu\text{L}$   $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$  odpovídající koncentraci 8,95 mM na 1 mL media (Obr. 17, str. 41).

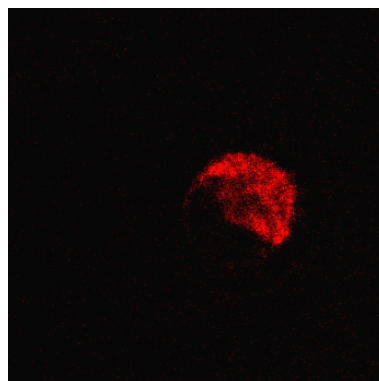




**Obr. 15: Autofluorescence buňky  
HeLa.**



**Obr. 16: [Eu(H<sub>2</sub>O)(do3a-hp)]  
v buňce HeLa.**



**Obr. 17: [Eu(L)]<sub>7</sub>-β-CD v buňce  
HeLa.**

Fotografie pořízena fluorescenčním mikroskopem IX-81 Cell-R Olympus, zvětšení objektivu 60x, rozměr fotografie 30x30 μm.

## 5. Závěr

Byla připravena a charakterizována zvolená analoga  $T_1$ -kontrastních látek pro MRI.

Pro stanovení koncentrace paramagnetických komplexů ve vodném roztoku byla aplikována metoda NMR-BMS a Evansova rovnice.

Bylo potvrzeno, že volný ligand DTPA i trojmocný kation europia jsou velmi toxické, a proto je při vývoji kontrastních látek zapotřebí klást velký důraz na stabilitu komplexních sloučenin v různých podmínkách, které mohou nastat *in vivo*.

Nejšetrněji působila na buňky přítomnost makrocyclických sloučenin, jejichž vazba na centrální atom je velmi stabilní. Jejich nízká toxicita je zřejmě zapříčiněna i jejich velikostí, která zhoršuje prostupnost přes plazmatickou membránu. Velmi nízké hodnoty toxicity vykazovaly nenabitě komplexy  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$  a  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{do3a-hp})]$ .

Ze šestice testovaných komplexů vykazoval nejvhodnější vlastnosti pro zobrazení pomocí fluorescenční mikroskopie  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})(\text{dtpa-ba})]$  (obecně nejlepší internalizace do buněk).

Pro účel studia buněčné distribuce europitých komplexů v buněčných kulturách mají nejlepší předpoklady suspenzí buňky B-lymfocytů, z důvodu endocytické a pinocytické aktivity a rychlosti buněčného cyklu (obecně velmi dobrá internalizace ukázaná na příkladu velké molekuly  $[\text{Eu}(\text{L})]_7\text{-}\beta\text{-CD}$ ).

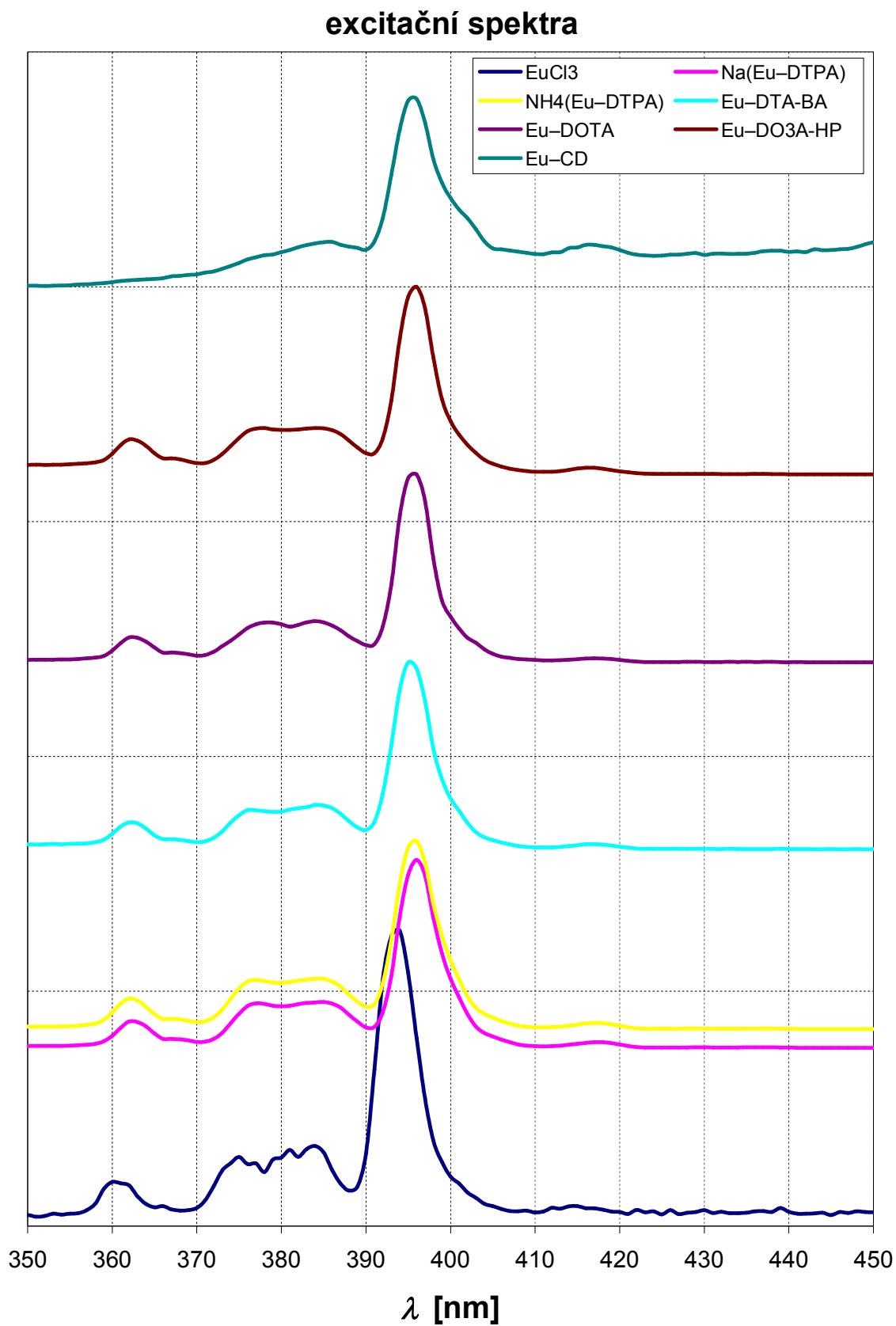
## 6. Použitá literatura

1. Stern, O.: The Method of Molecular Rays, Nobel lecture, 1946
2. <http://www.nndb.com/people/740/000099443/>, 23.4.2010
3. Pauli, W.: Naturwiss, 12, 741 (1924)
4. Segre, E.: Otto Stern 1888-1969. National Academy of Sciences, Washington D. C. (1973)
5. Alvarez, L.W., Bloch, F.: Phys. Rev. 57, 111–122 (1940)
6. Bloch, F.: The Principle of Nuclear Induction, Nobel lecture, 1952
7. Purcell, E.M.: Research in Nuclear Magnetism, Nobel lecture, 1952
8. Lauterbur, P.C.: Nature, 242, 190-191 (1973)
9. Buxton, R.B.: Nuclear Magnetic Resonance, v knize Introduction to functional Magnetic Resonance Imaging, Cambridge University Press, Cambridge, str. 64-67 (2002)
10. Weishaupt, D., Köchli, V.D., Marinček, B.: Spin and the Nuclear Magnetic Phenomenon, v knize How does MRI work?, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 1-2 (2003)
11. Rinck, P.A.: Magnetic Properties of Nuclei, v knize Magnetic Resonance in Medicine, Wiley-Blackwell, Berlin, str. 10-11 (2001)
12. [www.uochb.cz/web/document/cms\\_library/747.pdf](http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/747.pdf), 23.4.2010
13. Lee, V.S.: Humans as Protons and Protons as Magnets, v knize Cardiovascular MRI, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, str. 4 (2006)
14. Atkins, P.W.: Jadrové magnetické momenty, v knize Fyzikálna chémia, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, str. 84 (1999)
15. Atkins, P.W.: Energie jadier v magnetických poliach, v knize Fyzikálna chémia, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, str. 84-85 (1999)
16. Rinck, P.A.: Magnetization, v knize Magnetic Resonance in Medicine, Wiley-Blackwell, Berlin, str. 14 (2001)
17. [http://fmri.mchmi.com/main\\_index.php?strana=13](http://fmri.mchmi.com/main_index.php?strana=13), 13.5.2010
18. Lee, V.S.: The Larmor Frequency and Larmor Equation, v knize Cardiovascular MRI, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, str. 12 (2006)
19. Rinck, P.A.: The Magnetic Resonance Signal, v knize Magnetic Resonance in Medicine, Wiley-Blackwell, Berlin, str. 16-17 (2001)
20. Rinck, P.A.: Frequency Analysis: Fouriere Transformation, v knize Magnetic Resonance in Medicine, Wiley-Blackwell, Berlin, str. 18 (2001)
21. Harris, R.K., Becker, E.D., Cabral De Menzenes, S.M., Granger, P., Hoffman, R.E., Zilm, K.W.: Solid State Nuclear Magnetic Resonance 33, 41-56 (2008)

22. [http://education.jlab.org/qa/mathatom\\_04.html](http://education.jlab.org/qa/mathatom_04.html), 13.5.2010
23. Westbrook, C., Kaut, C.: Encoding and Image Formation, v knize MRI in Practice, Blackwell Science, Oxford, str 46-52 (1993)
24. Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., Laufer, R.B.: Chem. Rev., 99, 2293-2352 (1999)
25. Alford, J., Chronik, B., Scholl, T.: International Application Number PCT/CA2009/001538, 2009
26. Brown, M.A., Semelka, C.R.: Relaxation, v knize MRI: Basic Principles and Applications, Wiley-Blackwell, New Jersey, str 17-29 (2010)
27. Rajan, S.S.: Image Contrast and Pulse Sequence, v knize MRI: a Conceptual Overview, Springer-Verlag, New York, str 40-50 (1998)
28. Hermann, P., Kotek, J., Kubiček, V., Lukeš, I., Dalton Trans., 23, 3017-3124, 2008
29. Gansbeke, D.V., Thierry, M.M., Matos, C., Nicaise, N., Gay, F., Raeymaekers, H., Struyven, J.: JMRI, 7, :482-489 (1997)
30. Weinman, R.J., Laniado, M., Muetyel, W.: Physiol Chem. Phys. Med. Nucl. Magn. Reson., 16, 167-172 (1984)
31. Laus, S., Ruloff, R., Tóth, É., Merbach, E.A.: Chem. Eur. J., 9, 3555-3566 (2003)
32. Cacheris, W.P., Quay, S.C., Rocklage, S.M.: Magn. Reson. Imag., 8, 467 (1990)
33. Datta, A., Hooker, J.M., Botta, M., Francis, M.B., Aime, S., Raymond, K.N.: J. Am. Chem. Soc., 130, 2546–2552 (2008)
34. Kašparová, L., Wranová, K.: České pracovní lékařství, 2-3, 103-106 (2008)
35. Corsi, D.M., Platas-Iglesias, C., van Bekkum, H., Peters, J.A.: Magn. Reson. Chem., 39, 723–726, (2001)

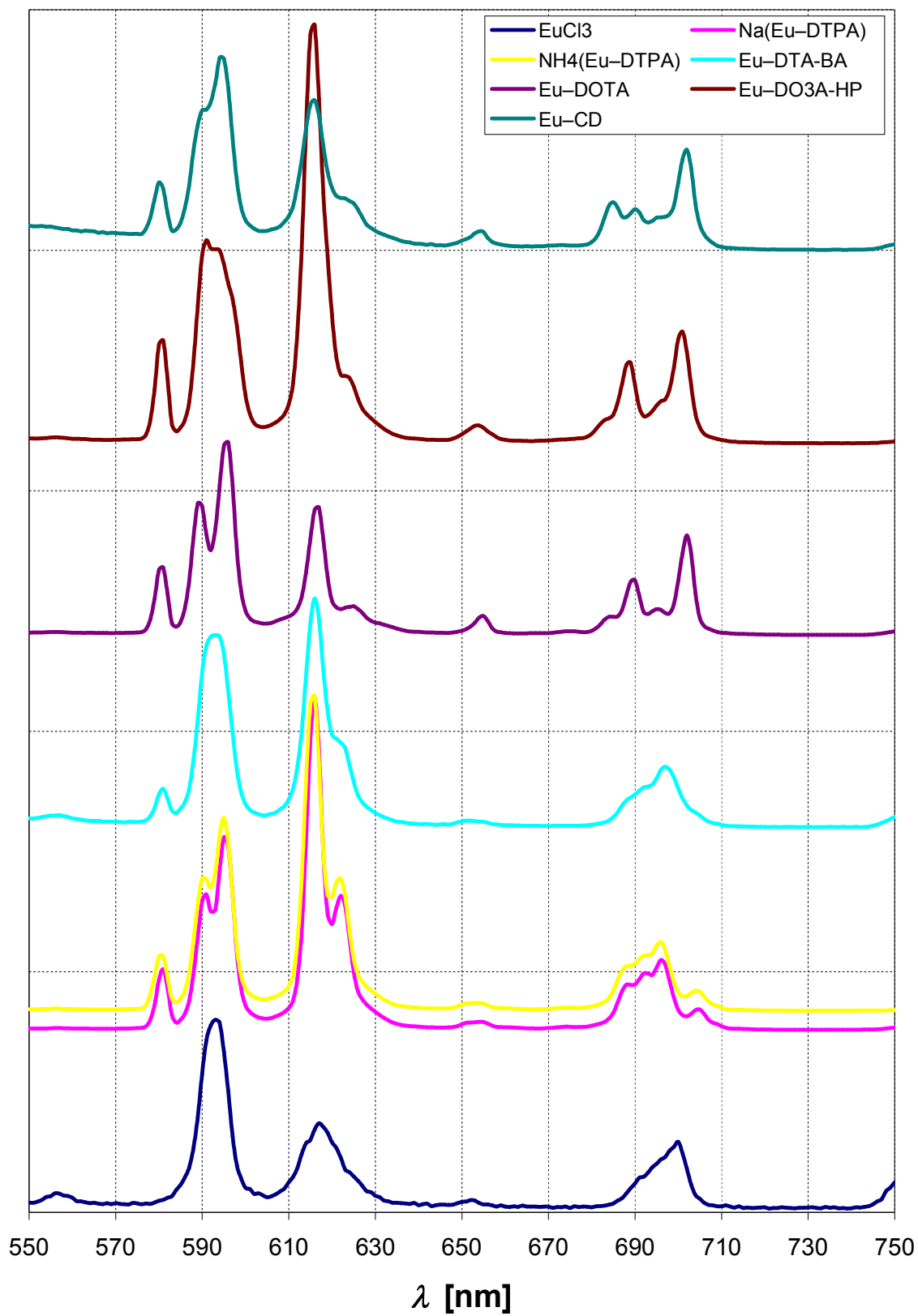
## 7 Přílohy

### 7.1 Excitační spektrum komplexů



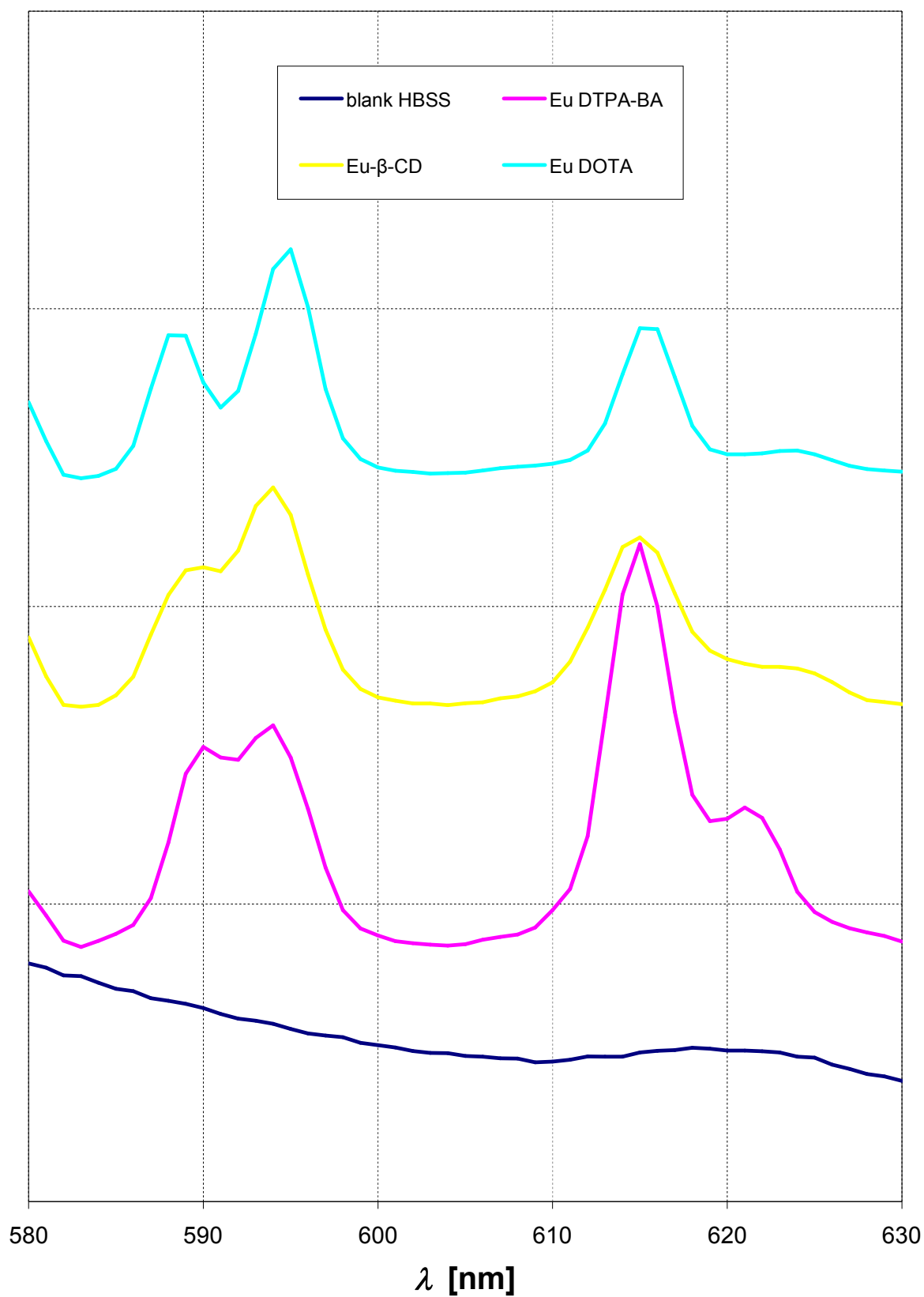
## 7.2 Emisní spektrum komplexů

emisní spektra



### 7.3 Emisní spektrum značených buněčných suspenzí

#### excitační spektra



## **Poděkování**

Staří Féničané říkají, že od té doby, co byly vynalezeny peníze, se neděkuje. Já ale nejsem ani starý, ani Féničan, a tak bych chtěl poděkovat všem, co se fyzicky i psychicky podíleli na vytvoření této práce.

Hlavní dík náleží Honzovi Kotkovi za jeho didaktické schopnosti a trpělivý přenos zkušeností. Děkuji všem členům vědeckospolečensky gurmánského prostředí velkého i malého labu za možnost se zařadit do tak skvělého kolektivu a čerpat z něj moudrosti i blbosti. Děkuju hlavně Kátě, Terce, Monice, Lud'ovi a Honzovi. Děkuji.

Velký dík patří vedoucí práce Jitce Poljakové za její milé vedení, vytvoření ideálně pufrujícího prostředí pro tvorbu a nesmírnou obětavost a starostlivost v konečných fázích vývoje. Děkuji.

Děkuji konzultantovi Janu Martinu Černému, specialistovi přes biologickou část mé práce, za poskytnutí své laboratoře i svých schopností a při opravování testů nepřímo i své rodiny. Děkuji Vandě, Lukášovi, Barče i Leoně a hlavně Janě Dvořákové za zasvěcení do biologických tajů a pravidel. Děkuji.

Nyní bych chtěl poděkovat lidem, bez kterých by to vlastně nešlo. Chtěl bych poděkovat rodičům za to, že jsem, a hlavně za to, že jsem rád. Dále bych chtěl poděkovat prarodičům z otcovy strany za podědění jejich literárních genů a prarodičům z matčiny strany za podědění jejich chemických genů. Děkuji.

Děkuju mé milované Barče za to, jak se o mě pěkně starala a tolerovala mojí nadměrnou časovou vytíženost. Děkuji.

První poděkování patří strůjci celého nápadu Petru Hermannovi za poskytnuté zajímavé téma pro zpracování. Děkuji.

Děkuji Ondrovi Šebestovi a Radkovi Fišerovi za pomoc při mikroskopování a měření spekter. Děkuji.

Děkuji všem, co zastávají: „Dokud nejde o život, tak jde o bubu zezadu“. DÍKY!





