

## Moderní zobrazovací metody

Zuzana Krátká<sup>a</sup>, Iva Blažková<sup>b</sup>, Markéta Vaculovičová<sup>b,c</sup>, Vojtěch Adam<sup>b,c</sup>, René Kizek<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Gymnázium Brno-Řečkovice, Terezy Novákové 2, 621 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>c</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

### Modern imaging techniques

Quantum dots are small semiconductor nanoparticles with great fluorescence properties including broad excitation and narrow emission spectra, high quantum yields, high photostability, possibility to be synthesized in a wide variety of colors and suitability for functionalization they are new member of a family of fluorescent labels. Due to their unique optical and electrochemical properties they have proven to be very beneficial not only for biomolecule labeling for in vitro analysis but also for in vivo applications. This review article is focused on the current imaging methods. The usage of fluorescence methods in diagnosis is discussed. This paper concerns to the fluorescence imaging and possibilities of the usage of quantum dots in in vivo imaging.

**Přijato k publikování:** 21. 2. 2014

**Klíčová slova:** fluorescence; kvantové tečky; zobrazování

### Úvod

Diagnostika onemocnění je odjakživa nejdůležitější součástí medicíny a lékařství. Bez diagnózy jsou všechny moderní léky a léčebné postupy zbytečné. Některé nemoci nebo problémy zvládneme rozpoznat a určit například rýmu, vnější poranění nebo další. Ale biologické procesy uvnitř těla jsou hůře detekovatelné. Odjakživa se vědci zabývali tím, jak co nejméně invazivní formou nahlédnout do vnitřního fungování a uspořádání organismu. Nejlepší metodou k poznání těla byla po smrti člověka pitva, kterou se lidé snažili objasnit a přiblížit životní funkce a udělat další krok ve svých vědomostech. Zobrazovací metody nám umožňují různými způsoby proniknout lidským tělem bez fyzického kontaktu, a tím nahlédnout do fungování těla a určení případných problémů či odchylek. K tomuto účelu se používá různých prostředků, ať už elektromagnetického záření, rentgenového záření, ultrazvukových vln a dalších. V současné době se však pozornost hodně zaměřila na výzkum fluorescenčních zobrazovacích metod. V tomto případě neslouží k zobrazování vnější činitel, ale do těla je vpravena látka s fluorescenčními vlastnostmi. Touto metodou by za pomoci vhodné povrchové funkcionalizace mohlo být umožněno například označování konkrétního objektu v těle (národu, orgánu či léčiva)<sup>1</sup>. Například protilátka navázaná na kvantové tečky, která zaručí dopravení k objektu, proti kterému je protilátka určena (například protilátka proti prostatickým nádorovým

buňkám)<sup>2</sup>. Mezi potencionálně prakticky využitelné se řadí vedle organických fluoroforů také kvantové tečky, které projevují výborné fluorescenční vlastnosti a jeví se pro toto využití jako velice vhodné<sup>3,4</sup>. Jsou však částečně toxické, takže jejich použití je omezeno použitím vhodné povrchové vrstvy, která eliminuje negativní toxické účinky kvantových teček na organismus<sup>5</sup>. Kvantové tečky by mohly v budoucnu umožnit snadnou diagnostiku a tím dopomoci dalšímu významnému posunu v oblasti medicíny a lékařství.

### Obecně o zobrazovacích technikách

Zobrazovací techniky jsou techniky používané v biochemii a medicíně k zobrazování tkání a buněk, k jejich přiblížení, podrobnějšímu zkoumání struktury povrchu pozorovaného objektu, vnitřní anatomii, případně k určení velikosti objektu a dalších vlastností. Zobrazování objektů například v medicinském in vivo zobrazování nám pomáhá určit anatomii člověka, zaměřit určitý druh buněk v těle, určit typ buněk neznámého původu ze vzorku a tím určit druh onemocnění, případně detekovat viry, bakterie aj. Zobrazovací techniky nám zejména v medicíně pomáhají k zaměření odchylek od normálního stavu organismu, zachycení určitých problémů v organismu, k diagnostice onemocnění nebo určitých abnormalit v těle, a tím urychlit a navést k jejich vyřešení a uvedení do normálu, v případě diagnostiky nemoci například k nasazení vhodné léčby<sup>6</sup>.

## Zobrazovací techniky

Mezi zobrazovací techniky patří například elektronová mikroskopie (EM), která umožňuje mnohonásobné přiblížení tkáně až na rozlišení jednotlivých buněk a jejich další anatomie. Umožňuje sledovat i objekty menší než 1 nm. Tato zobrazovací technika umožňuje například odlišení různých degradací buněk, pohyb buněk, pozorování mitochondrií, jejich uspořádání v pletivu atd.<sup>7</sup>

Elektronová mikroskopie využívá k zobrazení místo fotonů, které se používají u běžné optické mikroskopie, elektrony. Dělí se na různé typy, kterými jsou transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM)<sup>8</sup>.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) využívá k zobrazení vzorku procházející elektrony. Touto metodou lze sice zachytit i vnitřní strukturu vzorku, ale dá se použít jen pro zobrazení tenké vrstvy vzorku<sup>8</sup>.

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) využívá k zobrazování sekundární nebo zpětně odražené elektrony. Slouží k zobrazení povrchu vzorku. Elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku a tím vytváří obraz<sup>8</sup>.

K mikroskopovému zobrazování s dostatečnou schopností zvětšení však nejsou řazeny pouze elektronové mikroskopy. Mikroskopie atomových sil (AFM) je mikroskopická technika, která slouží k 3D zobrazování. Základem je ostrý hrot, který bod po bodu zkoumá povrch vzorku, kontaktně nebo bezkontaktně za pomoci van der Waalsových sil<sup>9</sup>.

Mezi techniky používané především v medicínské praxi, patří rentgenové záření a počítačová tomografie (CT). Rentgenové záření je forma elektromagnetického záření o vlnové délce 10 nanometrů až 1 pikometr. Rentgen se hojně využívá při lékařských vyšetřeních, ale je nebezpečný pro lidské tělo, jelikož se jedná o formu ionizujícího záření. Tato schopnost trvalého poškození tkáně je sice v zobrazování nežádoucí, avšak v léčbě rakoviny využitelná ve prospěch pacienta. Nádor se ozařuje rentgenovým zářením v přesně odměřených dávkách, které způsobí jeho cílené odstraňování. Rentgenové záření dobře proniká měkkými tkáněmi těla, například pokožkou a svaly. Počítačová tomografie je zobrazovací technika, která využívá rentgenového záření k vytváření trojrozměrných snímků. Používá přístroj, který má kružnicový tvar, a do jeho vnitřní části se zasune pozorovaný objekt (většinou jde o *in vivo* zobrazování – živý člověk). Kolem objektu

se pohybuje rentgenka, která ho z různých stran prozařuje rentgenovým zářením a za pomoci počítače se vytvoří 3D snímek. V zobrazování se dále používá ultrazvuk, který využívá zvukových vln o vysoké frekvenci. Tyto vlny neprojdou skrze celé tělo, ale odrazí se od každého objektu v jiné míře a vrací se zpět k vysílači zvuku. Pomocí počítače je z těchto signálů tvořen na obrazovce obraz<sup>10</sup>. Další technikou je magnetická rezonance (MR), která využívá velké magnetické pole a elektromagnetické vlnění s vysokou frekvencí. Přístroj vypadá podobně jako CT, ale na rozdíl od něj nenese žádná zdravotní rizika. Tento přístroj umožňuje tvorbu snímků řežů objektem, a při vytvoření dostatečného množství snímků také 3D obraz. Nevýhodou tohoto zobrazování je však hluchost a délka vyšetření. Díky této délce, která se pohybuje okolo 30 min, je nekvalitní zobrazení pohybujících se částí v těle (např. klíčky ve střevech)<sup>11</sup>.

Pozitronová emisní tomografie (PET) je další lékařská zobrazovací metoda. Principem metody je lokalizace místa vzniku fotonů, které v těle vznikají při anihilaci pozitronů uvolněných podanou radioaktivní látkou (radiofarmakem) a elektronů. Detekce uvolněných fotonů je uspořádána tak, že je možná trojrozměrná rekonstrukce aktivity podané látky v těle. Pozitronová emisní tomografie tedy nezobrazuje ani tak anatomickou strukturu, jako spíše ochotu konkrétní tkáně vychytávat příslušné radiofarmakum<sup>12,13</sup>. Mezi další, méně rozšířené zobrazovací metody patří například optická koherentní tomografie, která je díky infračervenému záření schopná vytvořit kvalitní snímky biologické tkáně (vrstvy kůže, rohovky). Tento typ zobrazování se používá hlavně v oftalmologii<sup>14</sup>.

## Využití fluorescence k zobrazování

V současné době se věnuje velká pozornost fluorescenčnímu zobrazování<sup>15</sup>. Ve fluorescenčním zobrazování je potřeba kvalitních zobrazovacích prostředků. Tyto fluorescenční značky, jiným názvem fluorofory, musí mít dobré fluorescenční vlastnosti, vysokou intenzitu fluorescence, dobře prozářit tkáň a také mít vhodnou velikost, která by měla být několikrát menší než zobrazované buňky, kvůli přesnějšímu zaměření objektu<sup>16</sup>. Toto zobrazování je sice zatím ve fázi vývoje, avšak připisuje se mu velký potenciál a do budoucna by mohlo jít o další široce využívanou lékařskou zobrazovací techniku. Což by mohlo přinést velký pokrok v oblasti diagnostiky<sup>17</sup>. Fluorescence

je fyzikálně chemický děj, který je druhem luminescence. Elektrony fluoroforů přecházejí po absorpci energie dopadajícího záření v atomovém obalu do vzdálenějších vrstev, takže energie atomu se zvyšuje. Tyto vyšší energetické stavy jsou však nestabilní a elektrony se během krátkého časového úseku vracejí do své původní pozice. Přebytková energie je vyzářena v podobě fotonu<sup>18</sup>.

Fluorescenčních značek by mohlo být využito například při detekci nádorových onemocnění. Do těla by mohly být vpraveny fluorofory s navázanou cílenou látkou (například protilátkou proti nádorovým buňkám), tato látka by umožnila navázání fluoroforu na nádor a tím jeho detekci pomocí fluorescenčních metod. Tato technika by se také dala využít k navázání fluoroforu na léčivo a ke sledování jeho transportu v lidském organismu. Při kombinaci různých fluoroforů by se mohlo zobrazit současně také více druhů objektů. Tato technika by mohla neinvazivně a bezpečně přesně určit polohu objektu v těle. Případně po vpravení většího množství druhů protilátek s navázanými různými fluorofory bychom mohli určit, která protilátka se navázala a tím určit například typ nádoru. Za pomoci kvalitního fluorescenčního zobrazovacího přístroje v kombinaci s rentgenem bychom pak mohli pořídit snímek organismu a přesně určit velikost a rozsah nádoru<sup>19,20</sup>.

Takovým přístrojem je například Carestream In-Vivo Xtreme Imaging System (Carestream Health, Inc., Rochester, USA), který umožňuje vytvoření rentgenového snímku, a poté také excitaci aplikovaných kvantových teček a následně vytvoření snímku emitovaného záření za pomoci 4 MP CCD detektoru. Tento přístroj je vybaven 400 W xenonovou zářivkou, 28 excitačními (410 nm – 760 nm) a 6 emisními filtry (535 nm – 830 nm). Rentgenový a fluorescenční záznam objektu je poté spojen v softwaru a tím lze přesně určit polohu, software mimo jiné také umožňuje intenzitu fluorescence fluoroforu, která prošla skrze tkáň.

### Využití kvantových teček při fluorescenčním zobrazování

Místo organických fluoroforů by mohly být použity anorganické materiály. Mezi takto využitelné materiály patří také kvantové tečky, což jsou polovodičové nanokrystaly s velikostí 1–100 nm. Kvantové tečky jsou podle výzkumů 20krát jasnější a 100krát fotostabilnější ve srovnání s běžnými fluorofory<sup>16</sup>. Jejich

malá velikost je výhodná při kontaktu s buňkami. Mají velký kvantový výtěžek a emitují v celé viditelné oblasti spektra. Jedna nanočástice (kvantová tečka) může obsahovat 100 – 100 000 atomů<sup>21</sup>. Jejich emisní spektra jsou velmi úzká, ale excitovat mohou v celém spektru vlnových délek. Nejčastěji používané a studované kvantové tečky se skládají z jádra CdTe nebo CdSe. Kvantové tečky mohou mít různou velikost, což je způsobené odlišnými podmínkami při přípravě těchto látek. Kvantové tečky větší velikosti emitují záření větší vlnové délky (např. červené barvy – vlnová délka kolem 700 nm), tečky menší velikosti záření nižších vlnových délek (např. zelené, kolem 550 nm)<sup>22</sup>. Diskutovaná je otázka toxicity kvantových teček, což se jeví v biologickém a hlavně v in vivo zobrazování, jako určitá překážka. Proto se stále testují nové krycí povrchové vrstvy těchto kvantových teček, aby se zamezilo negativním účinkům na organismus na minimum<sup>23,24</sup>. Kvantové tečky jsou pokrývány organickými molekulami a makromolekulami, aby byly schopné biokonjugace a byly rozpustné ve vodě. Tento povlak může být na bázi ligandu nebo polymeru, neutrální nebo nabitý. Ligandové povlaky jsou tvořeny z malých molekul, které jsou přímo na anorganickém povrchu kvantové tečky. Nejčastějšími ligandy, které se používají k pokrývání kvantových teček, jsou kyselina merkaptopropionová a kyselina merkaptosukcinová<sup>21</sup>.

Popularita kvantových teček do značné míry těží z momentálního bouřlivého rozvoje nanotechnologií. Jako fluorescenční značky jistě přinesly některé výborné vlastnosti, například vysokou intenzitu fluorescence a možnosti odlišení kvantových teček zejména pomocí odlišných emisních vlnových délek různých druhů kvantových teček a různých absorbančních maxim, která jsou pro každý druh charakteristická. Komerční dostupnost kvantových teček je zatím poměrně omezená, a to zejména pokud je zapotřebí derivátů vhodných pro rychlé a pohodlné fluorescenční značení; v tomto aspektu zatím převládají organické fluorofory<sup>25</sup>. Kvantové tečky mají však také některé nevýhody, především velkou velikost, která je srovnatelná se zobrazovanými buňkami, ale hlavně toxicitu, která se musí eliminovat povrchovými vrstvami.

### Výzkum a aplikace kvantových teček

Zajímavou studii publikoval Choi a jeho kolegové, kteří zkoumali epigenomické a genotoxické chování CdTe kvantových teček v lidských buňkách karcinomu prsu. Naznačují tři úrovně buněčných změn

vyvolaných nanočásticemi: negenomické, genomické a epigenetické. Epigenetické změny mohou mít dlouhodobý vliv na genovou expresi, a to i dlouho poté, co byl odstraněn původní činitel. To by mohlo vést k dlouhodobým nežádoucím účinkům v organismu<sup>26</sup>. Yong prokázal, že dodáním manganu ke kvantovým tečkám a jejich následnou povrchovou funkcionalizací pomocí lyzinu docílíme jejich rovnoměrnému rozptýlení ve vodném roztoku a že tyto tečky emitující v blízké infračervené oblasti, nepůsobují při injekčním podávání žádné dlouhodobé nežádoucí účinky u myši. Tyto kvantové tečky by mohly najít v blízké budoucnosti využití v zobrazování a detekci rakovinných buněk slinivky břišní v lidském těle<sup>27</sup>. Chen a jeho kolegové sledovali životaschopnost, chování a zdraví myši, kterým byly nitrožilně aplikovány thiolem pokryté CdHgTe kvantové tečky, a to po dobu tří měsíců. Bylo zjištěno, že injekce 2 µg/g CdTeHg kvantových teček nevykazuje významnou toxicitu, a nebylo pozorováno abnormální chování myši v žádném z in vivo experimentů<sup>17</sup>.

Nicméně, klíčovou otázkou stále zůstává, zdali mohou být kvantové tečky posunuty do klinické fáze výzkumu. Před jejich použitím v lidských aplikacích je potřeba ještě provést kompletní toxikologmii kvantových teček<sup>17</sup>.

## Závěr

Mezi moderní zobrazovací techniky se řadí rentgen, ultrazvuk, CT a další zobrazovací metody, které jsou hojně využívány v medicínské praxi. O fluorescenčním in vivo zobrazování se mluví jako o potenciální nově diagnostické technice, která by mohla být srovnatelná se současnými technikami. Kvantové tečky mají podle výzkumu skvělé vlastnosti a potenciál pro budoucí využití v praxi, především ve fluorescenčním zobrazování. Tato metoda by mohla najít uplatnění v medicíně a biochemii. Kvantové tečky mají však také některé nevýhody, především velkou velikost, která je srovnatelná se zobrazovanými buňkami, ale hlavně toxicitu, která se musí eliminovat povrchovými vrstvami. V budoucnu by se však mohlo jednat o dobrou, levnou a účinnou metodu, při které by se kvantové tečky za pomoci vhodné povrchové úpravy navázaly na potřebný objekt v organismu a následně by se detekovaly v zobrazovacím přístroji. Jedná se však zatím pouze o vizi, výzkum kvantových teček zatím nedospěl do klinické fáze výzkumu, ale jejich využití v budoucnosti je více než pravděpodobné.

*Tato práce byla financována ze zdrojů CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.*

## Literatura

1. Medintz I. L., Uyeda H. T., Goldman E. R., Mattoussi H.: *Nature Materials*, 4, 435 (2005).
2. Walling M. A., Novak J. A., Shepard J. R. E.: *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 441 (2009).
3. Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P.: *Science*, 281, 2013 (1998).
4. Resch-Genger U., Grabolle M., Cavaliere-Jaricot S., Nitschke R., Nann T.: *Nature Methods*, 5, 763 (2008).
5. Drbohlavova J., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 656 (2009).
6. Leblond F., Davis S. C., Valdes P. A., Pogue B. W.: *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 98, 77 (2010).
7. Mohammadi-Gheidari A., Kruit P.: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 645, 60 (2011).
8. Yoshimura N.: *Historical Evolution toward Achieving Ultrahigh Vacuum in Jeol Electron Microscopes*, 1 (2014).
9. de Pablo P. J.: *Single Molecule Analysis: Methods and Protocols*, 783, 197 (2011).
10. Hughes J., *Velká všeobecná encyklopedie, Svojtka & Co., s.r.o.*, 2002.
11. Seidl Z. V. M., *Magnetická rezonance hlavy, mozku a páteře*, 2006.
12. Ter-Pogossian M. M., Phelps M. E., Hoffman E. J., Mullani N. A., *Positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT)*, 1975.
13. Phelps M. E., Hoffman E. J., Mullani N. A., Ter-Pogossian M. M.: *Journal of Nuclear Medicine*, 16, 210 (1975).
14. Fercher A. F., Menedoht K., Werner W.: *Optics Letters*, 13, 186 (1988).
15. Ntziachristos V., Bremer C., Weissleder R.: *European Radiology*, 13, 195 (2003).
16. Tan W. H., Wang K. M., He X. X., Zhao X. J., Drake T., Wang L., Bagwe R. P.: *Medicinal Research Reviews*, 24, 621 (2004).
17. Chen H., Wang Y., Xu J., Ji J., Zhang J., Hu Y., Gu Y.: *Journal of Fluorescence*, 18, 801 (2008).
18. Fišar Z.: *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů :: Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze [online]*, (2012).
19. Gao J. H., Chen K., Xie R. G., Xie J., Yan Y. J., Cheng Z., Peng X. G., Chen X. Y.: *Bioconjugate Chemistry*, 21, 604 (2010).
20. Ghaderi S., Ramesh B., Seifalian A. M.: *Journal of Drug Targeting*, 19, 475 (2011).
21. Algar W. R., Tavares A. J., Krull U. J.: *Analytica Chimica Acta*, 673, 1 (2010).
22. Hoshino A., Hanada S., Yamamoto K.: *Archives of Toxicology*, 85, 707 (2011).
23. Mohs A. M., Duan H., Kairdolf B. A., Smith A. M., Nie S.: *Nano Research*, 2, 500 (2009).
24. Smith A. M., Duan H., Mohs A. M., Nie S.: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1226 (2008).
25. Hlavacek A., Skladal P.: *Chemické Listy*, 105, 611 (2011).
26. Choi A. O., Brown S. E., Szyf M., Maysinger D.: *Journal of Molecular Medicine*, 86, 291 (2008).
27. Yong K.-T.: *Nanotechnology*, 20, (2009).



Článek je volně šiřitelný  
pod licencí Creative  
Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit  
a používat pro komerční účely.