

Optyczne metody obrazowania molekularnego

Optical methods of molecular imaging

Tomasz Soltysiński, Adam Liebert, Ignacy Zawicki, Roman Maniewski

Institut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, Polska Akademia Nauk, ul. Trojdena 4, 02-109 Warszawa, tel. +48 (0) 22 6599143, e-mail: tsoltysinski@ibib.waw.pl

Streszczenie

Obrazowanie molekularne jest szybko rozwijającą się dziedziną badań w zakresie biotechnologii i inżynierii biomedycznej. W artykule przedstawiono przegląd technik stosowanych w obrazowaniu molekularnym, wykorzystujących metody medycyny nuklearnej oraz optyczne techniki oparte na analizie promieniowania fluorescencyjnego. W szczególności opisano metody optyczne obrazowania molekularnego stosowane w skali mikroskopowej (mikroskopia konfokalna, obrazowanie czasu relaksacji fluorescencyjnej, transfer energii Foerstera) oraz wykorzystywane w badaniach na zwierzętach doświadczalnych. Omówiono także potencjalne wykorzystanie technik optycznych w badaniach dużych objętości tkanek.

Słowa kluczowe: metody optyczne, obrazowanie molekularne

Abstract

Molecular imaging (MI) is a rapidly emerging field of biomedical, biotechnological and engineering research. This study provides a brief review of the state-of-the-art techniques and methods of MI based on nuclear physics and fluorescent agents. Special attention will be focused on optical methods of MI applied in microscopic scale (multiphoton confocal microscopy, fluorescence lifetime imaging, Forster energy transfer) and in experimental animals. Potential application of MI in large tissue volumes will be also discussed.

Ke words: optical methods, molecular imaging

Wprowadzenie

Obrazowanie molekularne należy do technik biomedycznych i biotechnologicznych pozwalających na analizę molekularnych i wewnątrzkomórkowych zjawisk występujących w organizmach żywych i prowadzących do zrozumienia procesów fizjologicznych i patologicznych w skali molekularnej. Obrazowanie zjawisk zachodzących na poziomie molekularnym czy wewnątrzkomórkowym jest możliwe dzięki wprowadzaniu do organizmów żywych znaczników, których wiązanie z elementami struktury tkankowej pozwala na przestrzenną ocenę tych struktur, a także monitorowanie procesów w nich zachodzących [1].

Obrazowanie molekularne jest pochodną postępu w zakresie biologii komórkowej i molekularnej oraz metod projektowania leków. Rozwój metod obrazowania molekularnego wymagał opracowania nowych znaczników, wykorzystując techniki nanoinżynierii. Istotne znaczenie miało także opracowanie nowych, wydajnych metod obrazowania biomedycznego oraz przetwarzania i analizy obrazów.

Pierwsze próby znakowania i śledzenia określonych obiektów mikrobiologicznych podjęto na początku lat 70. na potrzeby metod medycyny nuklearnej. Szybki rozwój technik obrazowania molekularnego nastąpił w połowie latach 90., wraz z rosnącym zainteresowaniem medycyną komórkową i molekularną oraz powstaniem i upowszechnieniem biotechnologii, rozwojem technik laserowych i optoelektronicznych oraz dostępnością dużych mocy obliczeniowych wymaganych do analizy uzyskiwanych obrazów.

Obrazowanie molekularne pozwala na przestrzenne i czasowe lokalizowanie oddziaływań wewnątrzkomórkowych oraz na obrazowanie oddziaływania komórek w tkankach organizmów żywych. Szczególnie interesująca jest możliwość wykorzystania tych technik w analizie oddziaływań, które odpowiadają za rozwój procesów chorobotwórczych. Innym ważnym polem zastosowań obrazowania molekularnego jest śledzenie farmaceutyków w trakcie

ich interakcji z tkankami. Metody obrazowania mają szczególne znaczenie dla monitorowania nowych terapii działających i steryowanych na poziomie komórkowym i molekularnym [2, 3].

Obrazowanie molekularne może być realizowane za pomocą licznych technik, stosowanych często razem, jednocześnie lub sekwencyjnie. Mogą one być stosowane z wykorzystaniem egzogennych środków kontrastujących lub z zastosowaniem endogennych markerów. Do najczęściej stosowanych technik obrazowania molekularnego należą: spektroskopia [4, 5] i obrazowanie magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *magnetic resonance imaging* – MRI) [6], metody optyczne [7-13], ultrasonografia oraz techniki medycyny nuklearnej: komputerowej tomografii pojedynczego fotonu (ang. *single photon emission computed tomography* – SPECT) oraz emisyjnej tomografii pozytonowej (ang. *positron emission tomography* – PET).

Szczególne znaczenie dla obrazowania molekularnego miał rozwój technik SPECT oraz PET. Wysokoenergetyczne fotony gamma powstające w wyniku rozpadu promieniotwórczego bądź anihilacji par pozyton-elektron służą do stworzenia trójwymiarowego obrazu fizjologicznego rozmieszczenia radioaktywnych znaczników. Wprowadzenie znaczników do organizmu umożliwia obrazowanie na poziomie molekularnym oraz pozwala na śledzenie procesów metabolicznych [14, 15, 16]. Wysoka czułość PET i SPECT w śledzeniu znaczników oraz ich chemiczne cechy pozwalają wykorzystać tę technikę w diagnostyce schorzeń nowotworowych i chorób neurodegeneracyjnych. Techniki te intensywnie stosuje się w badaniach przepływów mózgowych, udarów, wylewów, przewodnictwa molekularnego przez barierę krew-mózg, konsumpcji tlenu oraz zmian metabolicznych, które towarzyszą chorobom oraz powodowanym w wyniku stymulacji mózgu i jego aktywacji w trakcie aktywności poznawczej, stymulacji wizualnej, motorycznej, emocjonalnej. Możliwość śledzenia dystrybucji oznakowanych cząstek chemicznych na poziomie molekularnym stawia PET i SPECT wśród najczulszych dostępnych obecnie metod nieinwazyjnego obrazowania medycznego [1].

Zastosowanie techniki MRI w obrazowaniu molekularnym jest możliwe dzięki stosowaniu znaczników paramagnetycznych. Koncentracja paramagnetycznych molekuł wywołuje zmiany sygnału MR obserwowane jako zmiany kontrastu w obrazie strukturalnym lub czynnościowym. Obrazowanie procesów czynnościowych na poziomie molekularnym jest możliwe dzięki monitorowaniu lokalnych zmian sygnału pochodzącego z krwi [6, 17]. Jest to jedna z najskuteczniejszych technik obrazowania przepływów krwi i perfuzji w mózgu i jego nowotworach oraz odwzorowywania aktywności neuronalnej mózgu. Zmiany w aktywności neuronalnej są powiązane ze zmianami przepływu krwi mózgowej, jej objętości, i utlenowania, które wiąże się z metabolizmem mózgu [18-22]. Zademonstrowano przydatność technik funkcjonalnego MRI w obrazowaniu neuroczynnościowym *in vivo* na poziomie pojedynczych komórek, z rozdzielczością dziesiątek mikronów i rozdzielczością czasową rzędu 100 ms [23].

Dynamicznie rozwijającą się gałęzią obrazowania molekularnego są badania wykonywane z zastosowaniem metod optycznych, a znaczniki stanowią barwniki wykazujące fluorescencję. Metody optyczne są stosowane do analizy subkomórkowej struktury z wykorzystaniem technik mikroskopowych oraz do oceny znaczników u małych zwierząt doświadczalnych. W dalszej części artykułu przeanalizujemy także możliwość wykorzystania tych technik w ocenie napływu i klirensu fluoroforu *in-vivo* u ludzi.

Obrazowanie mikroskopowe

Fluorescencja jednofotonowa

Obrazowanie mikroskopowe złożonych struktur komórkowych jest możliwe dzięki zastosowaniu fluorescencyjnych barwników

i metod zwiększających rozdzielczość: skanowania konfokalnego oraz wykonywanej komputerowo dekonwolucji obrazu i funkcji odpowiedzi instrumentu. Mikroskopia konfokalna opiera się na skanowaniu badanej próbki i analizie światła wyłącznie z ogniska optycznego obiektywu mikroskopu. Zwykle skanowanie odbywa się za pomocą systemu galwanometrycznych lusterek, który zapewnia przemieszczanie wiązki światła po powierzchni badanego preparatu. Inną metodą polega na przesuwaniu preparatu względem obiektywu. Odpowiedni przesuw preparatu względem obiektywu pozwala na uzyskanie rozdzielczości pomiaru w kierunku po osi wiązki promieniowania. Zastosowanie barwników powiązanych z przeciwciałem lub cząstkami wnikałymi w strukturę komórki i łączącymi się z wybranymi receptorami, pozwala na wybiórcze obrazowanie substruktur w badanej komórce. Wzbudzenie fluorescencji barwnika odbywa się zwykle za pomocą światła laserowego. Dzięki nieznacznemu (kilka-kilkadziesiąt nm) przesunięciu Stokesa długości fal pomiędzy szczytem krzywej absorpcji i emisji oraz zastosowaniu filtrów dolnozaporowych możliwe jest wyseparowanie sygnału emisji fluorescencyjnej, który wykorzystuje się do odtworzenia obrazu mikrostruktury. Dobierając barwniki, umieszczane selektywnie w komórce, i odpowiednie zestawy filtrów, można uzyskać obraz struktur komórkowych lub tkankowych. Wadą tej techniki jest wzbudzenie fluorescencji w objętości całego stożka, w którym propaguje się światło wewnątrz struktury preparatu, co pogarsza rozdzielczość przestrzenną i istotnie utrudnia analizę obrazu [24].

Fluorescencja wielofotonowa

Wspomniany problem rozdzielczości przestrzennej eliminuje się poprzez zastosowanie systemów wielofotonowych. Zjawisko dwufotonowe zostało przewidziane w 1931 roku przez urodzoną w Katowicach Marię Goeppert-Mayer, uhonorowaną w roku 1963 Nagrodą Nobla za prace nad modelem powłokowym jądra atomu. Zjawisko to zostało potwierdzone eksperymentalnie w latach 60., gdy powstały pierwsze lasery [25]. Zjawisko polega na jednoczesnej absorpcji dwóch identycznych fotonów (o sumarycznej energii bliskiej energii stanu wzbudzonego, w przeciwieństwie do zjawiska jednofotonowego, gdzie energia pojedynczego fotonu jest bliska tej energii) i wzbudzeniu pierwszego stanu singletowego. Jednoczesna absorpcja jest możliwa ze względu na opisywaną zasadą Heisenberga nieoznaczoność czasu i przestrzeni na poziomie kwantowym. Jeśli dwa fotony znajdują się w podobnej chwili czasu, nie później niż 10^{-15} - 10^{-16} s w absorbującym atomie, to prawdopodobieństwo wzbudzenia rośnie na tyle, że zjawisko to może być wykorzystane w praktyce. Podobnie odbywa się absorpcja większej liczby fotonów, np. w zjawisku trójfotonowym. Uzyskanie odpowiedniej kondensacji fotonów jest możliwe tylko przy zastosowaniu laserowych źródeł światła, zwykle femto- i pikosekundowych, oraz optycznych układów skupiających wiązkę światła, co zapewnia właściwą gęstość fotonów tylko w bezpośrednim otoczeniu punktu ogniskowego, a nie w całym stożku propagacji, jak we fluorescencji jednofotonowej. Zapewnia to znaczne poprawienie rozdzielczości przestrzennej obrazowania. Widma barwników jednofotonowych są dobrze zbadane w przeciwieństwie do widm barwników wielofotonowych [4].

Właściwości fluorescencyjne białek, naturalnych chromoforów i składników biologicznych tkanek wykorzystuje się do badania widma autofluorescencji, np. skóry. Wzbudzając chromofory tkankowe jednofotonowo, obserwuje się emisję zależną od składowych skóry [26]. Podobnie, widmo emisyjne powstaje przy wzbudzeniu nieliniowym, dwu- lub więcej fotonowym. Różnicując czasy relaksacji autofluorescencji dla poszczególnych składowych tkanki skóry, można wyodrębnić jej komponenty i przeprowadzić diagnozę stanu skóry. Metody te pozwalają obrazować mitochondria wewnątrzkomórkowe, melanosomy, morfologię jądra komórkowego, oraz składniki okołokomórkowe. W ten sposób obrazuje i określa się obecność oksydazy NAD(P)H, melaniny, elastyny, kolagenu, nanocząstek i wprowadzonych do tkanek leków [13].

Pomiar czasu relaksacji fluorescencyjnej

Inną techniką obserwowania struktur komórkowych i pojedynczych molekuł fluorescencyjnych jest czasowo-rozdzielcze zliczanie fotonów [27]. Układ mikroskopowy jest w tym przypadku

wyposażony w szybkie układy fotodetekcyjne (fotopowielacze lub diody lawinowe) i elektronikę, pozwalającą na skorelowane w czasie zliczanie pojedynczych fotonów. W tej konfiguracji przyrząd pozwala wyznaczyć rozkłady czasów przelotów fotonów dla różnych długości fali światła fluorescencyjnego, dystrybucję natężenia światła fluorescencyjnego, dystrybucję czasów relaksacji fluoroforu, anizotropię i polaryzację fluorescencyjną czy fluorescencyjne widmo korelacyjne [28]. Alternatywnym pomiarem jest ocena przesunięcia fazowego modulowanej częstotliwościowo fali świetlnej. Przesunięcie fazowe jest bezpośrednio powiązane z czasem przelotu fotonów, którego składnikiem jest czas relaksacji fluorescencyjnej [29, 30]. Pomiar rozkładu czasu relaksacji fluorescencyjnej jest szczególnie wartościowy, ponieważ zależy on istotnie od właściwości ośrodka, w którym znajduje się badany fluorofor [31].

Obrazowanie czasu relaksacji fluorescencyjnej FLIM (ang. *fluorescence life-time imaging*) to, oprócz widma i natężenia promieniowania fluorescencyjnego, kolejny sposób obrazowania za pomocą fluoroforu. Ponadto służy do separacji emisji różnych fluoroforów, badania koncentracji jonów, ich przechwytywania w komórkach, oddziaływania między białkami. Szczególnie przydatne jest w rozróżnianiu składowych widm autofluorescencji tkanki [12]. Czas życia fluoroforu jest bezpośrednim znacznikiem stopnia zaniku fluorescencji w związku z lokalnym oddziaływaniem wzbudzonej molekuli z otoczeniem [32]. Czas życia fluoroforu, w przeciwieństwie do natężenia, nie zależy od koncentracji fluoroforu i jest wykorzystywany do określania stężenia jonów oraz utlenowania [9, 33]. Fluorofory występują zarówno w formie sprotonowanej, jak i zdeprotonowanej, a ich równowaga zależy od pH. Jeśli obie formy mają różne czasy życia, to średni czas życia fluoroforu jest wyznacznikiem lokalnego pH [10, 34, 35]. Czasy życia różnią się również w zależności od tego, z czym związany jest fluorofor, czy jest to białko, lipid czy DNA [5, 7, 8], co pozwala na rozróżnianie elementów komórki. Różnice czasów życia wykorzystano również jako znaczniki wartości lokalnego współczynnika załamania światła w ośrodku [11].

Kolejnym sposobem badania oddziaływań między molekułami jest obserwowanie zjawiska FRET (ang. *Fluorescence/Forster Resonance Energy Transfer*). Zjawisko to występuje, gdy widmo absorpcji akceptora pokrywa się z widmem emisji donora energii. W trakcie transferu energii nie jest emitowany foton. FRET zachodzi, gdy donor i akceptor są w odległości 10-100 angstromów (10^{-10} m). Zjawisko zachodzi według schematu: wzbudzenie donora, relaksacja do pierwszego stanu singletowego, transfer energii do akceptora i jego wzbudzenie, emisja fotonu z akceptora [4].

FRET jest wykorzystywany do badania przekazywania sygnałów do i z komórek na poziomie molekularnym, oddziaływań między białkami w żywych komórkach, kompozycji białek na powierzchni komórki w skali nanometrowej. W praktyce pomiary z wykorzystaniem zjawiska FRET wykonuje się poprzez pomiar anizotropii fluorescencji [36].

Fluorescencyjna spektroskopia korelacyjna

Fluorescencyjna spektroskopia korelacyjna (ang. *fluorescence correlation spectroscopy* – FCS) jest techniką mikroskopową, pozwalającą na analizę procesów dyfuzji molekuł fluoroforu w obrębie badanej struktury komórkowej [28, 37, 38, 39]. Wykorzystanie układu mikroskopu fluorescencyjnego pozwala na uzyskanie z pojedynczego położenia wiązki laserowej fluktuacji sygnału poddawanego detekcji. Fluktuacja ta jest powiązana ze stochastycznym charakterem interakcji między molekułami fluoroforu oraz pola fotonów w obrębie ogniska obiektywu. Zjawiska napływu bądź odpływu molekuli z obszaru ogniska skutkują zmianami sygnału notowanego na detektorze. Analiza autokorelacji sygnału poddawanego detekcji pozwala na ocenę współczynnika dyfuzji molekuł barwnika w badanym medium.

Fluorescencyjna spektroskopia korelacyjna znajduje zastosowanie w biologii, ale również w inżynierii materiałowej. W biologii wykorzystywana jest m.in. do badania dynamiki molekularnej w żyjących komórkach. Pozwala wyznaczyć ilościowe współczynniki dyfuzji, parametrów hydrodynamicznych, średnich stężeń fluoroforów lub skojarzonych z nimi molekuł oraz kinetycznych właściwości reakcji chemicznych [40, 41, 42].

Mikroskopia fluorescencyjna z całkowitym wewnętrznym odbiciem

Metoda ta (ang. *total internal reflection fluorescence* – TIRF) opiera się na zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia fali świetlnej w ośrodku o niższym współczynniku załamania i wytwarzaniu zanikającego pola energii penetrującej w głąb tkanki na głębokość do kilkuset nm. Dobierając właściwy kąt padania fali świetlnej, możliwe jest takie oświetlenie preparatu, aby światło wzbudzające nie wnikało do jego struktury. Uzyskana fluorescencja pochodzi wtedy tylko od fali zanikającej, powstającej podczas całkowitego wewnętrznego odbicia. Zbierając sygnał fluorescencyjny, można badać zjawiska, które zachodzą na bardzo niedużych głębokościach w badanej próbce (do kilkuset nm). Jest to obszar o grubości mniejszej niż długość fali światła, które wykorzystuje się do wzbudzenia fluoroforu. Pozwala to na unikalne zastosowania, do których należą m.in.: badanie adhezji na powierzchniach komórek, trójwymiarowe obrazowanie dynamiki pojedynczych molekuł, wnikanie jonów wapnia w pojedyncze kanały wapniowe, równoczesne śledzenie optycznych i elektrycznych właściwości kanałów jonowych [43].

Obrazowanie molekularne w dużych objętościach tkanek

Metody mikroskopowe opisane powyżej mogą być stosowane w ograniczonym zakresie w badaniach na organizmach żywych *in vivo*. W szczególności bardzo szybkie metody obrazowania pokrewne mikroskopii konfokalnej są wykorzystywane w badaniach ukrwienia mózgu małych zwierząt doświadczalnych, np. szczura, z dyskryminacją przepływów żylnych, tętniczych i kapilarnych [44, 45]. Mikroskopia dwufotonowa jest także wykorzystywana do oceny struktury skóry, przy czym zastosowanie obrazowania czasu relaksacji fluorescencyjnej pozwala na dyskryminację stężenia podstawowych fluoroforów zawartych w tkance [12]. Metoda ta była także stosowana do analizy wpływu środków farmakologicznych na skórę [13].

Optyczne metody obrazowania molekularnego mogą być stosowane także w badaniach makroskopowych na organizmach żywych. Wykorzystanie tych technik pozwala na analizę fizjologii tkanek i ich współdziałania w warunkach rozwijającej się patologii.

Obrazowanie molekularne w tkankach zwierząt eksperymentalnych z wykorzystaniem metod optycznych możliwe jest dzięki:

- dostępności znaczników, które selektywnie łączą się z wybranymi tkankami;
- penetracji tych znaczników przez bariery biologiczne, takie jak ściany naczyń czy błony komórkowe;
- dostępności metod obrazowania znaczników fluorescencyjnych o odpowiedniej rozdzielczości, czułości i szybkości detekcji promieniowania [46].

Obrazowanie molekularne oparte na ocenie fluorescencji barwników krążących w organizmach zwierząt doświadczalnych stało się istotnym elementem procedur projektowania leków i wykorzystywane jest w trakcie ich weryfikacji. Technika ta pozwala istotnie skrócić czas wymagany dla przedklinicznej oceny użyteczności leków. Analiza akumulacji znaczników w wybranych narządach wewnętrznych małych zwierząt doświadczalnych jest możliwa dzięki stosunkowo dobrej przejrzystości ich organizmów dla promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni. Pozwala ona na uwidocznienie skupisk fluoroforu oraz na tomograficzną analizę ich lokalizacji w organizmie badanego zwierzęcia [47, 48].

Do celów obrazowania optycznego stosuje się układy wielu światłowodów transmitujących światło laserowe o długości fali wzbudzenia do badanego obiektu, np. zwierzęcia, oraz kamer CCD do detekcji promieniowania fluorescencyjnego reemitowanego z badanej tkanki bądź transmitowanego przez nią [49]. Rekonstrukcja tomograficzna rozkładu fluoroforu w badanym organizmie oparta jest na wykorzystaniu:

- teorii perturbacji, która pozwala na powiązanie uzyskanych rozkładów intensywności promieniowania na powierzchni badanej tkanki z rozkładem przestrzennym stężenia fluoroforu przy założeniu, że stężenie to jest bardzo małe;

- współczynników czułości pomiaru dla różnych przestrzennych konfiguracji położenia optody emisyjnej i detekcyjnej. Do obliczenia tych współczynników stosuje się równanie dyfuzji fotonów dla założonego homogenicznego rozkładu właściwości optycznych badanego medium bądź metodę symulacji Monte Carlo dla medium niejednorodnego o właściwościach optycznych przyjętych na podstawie informacji o anatomii badanego zwierzęcia;
- iteracyjnych rozwiązań zagadnienia odwrotnego [50, 51, 52].

Metody optyczne stosowane w eksperymentach na zwierzętach doświadczalnych pozwalają na monitorowanie procesów nowotworowych, stanów zapalnych i infekcji tkanek, stanów chorobowych przebiegających z nasileniem zjawiska przenikania znacznika z układu naczyniowego do tkanek, a także procesów angiogenezy i apoptozy [46].

Techniki opierające się na analizie skupisk fluoroforu są często wykorzystywane w powiązaniu z innymi technikami obrazowanymi (rentgenografia, CT, MRI). Takie badania pozwalają na uwidocznienie tych skupisk na tle struktury anatomicznej badanego zwierzęcia. Wykorzystanie metod obrazowania optycznego podczas dożylnego wstrzyknięcia fluoroforu pozwala także na selektywną ocenę napływu znacznika do wybranych narządów wewnętrznych i ich rozpoznanie. Pomiaru tego typu pozwalają na równoczesną ocenę anatomicznej struktury badanego zwierzęcia i określenie położenia skupisk fluoroforu z zastosowaniem wyłącznie optycznych metod badawczych [53].

Techniki optyczne stosowane w eksperymentach na zwierzętach doświadczalnych mogą być potencjalnie stosowane *in vivo* u ludzi. Jednak ich wykorzystanie ograniczone jest do tkanek zewnętrznych lub odkrytych w wyniku działań chirurgicznych. Uwidocznienie skupisk fluoroforu znajdujących się na większych głębokościach *in vivo* u ludzi jest utrudnione ze względu na ograniczoną głębokość penetracji i nasilone rozpraszanie światła. Jedynie światło z zakresu bliskiej podczerwieni (700-900 nm) penetruje w tkankach na głębokość rzędu centymetrów. Dla fal świetlnych o długościach krótszych obrazowanie optyczne jest niemożliwe ze względu na wysoką absorpcję światła przez hemoglobinę, która jest istotnym składnikiem krwi krążącej w organizmie [54], natomiast fale świetlne dłuższe niż 900 nm są silnie absorbowane przez wodę.

W badaniach teoretycznych [55], eksperymentach na fantomach [56] oraz w eksperymentach na zwierzętach doświadczalnych wykazano możliwość detekcji promieniowania fluorescencyjnego pochodzącego ze skupiska fluoroforu w dużych objętościach tkanek. Na przykład pokazano możliwość obrazowania nowotworu sutka psa z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego [57].

W aplikacjach u ludzi obrazowanie skupisk fluoroforów w dużych objętościach tkanek jest możliwe tylko dla fluoroforów, których widma absorpcyjne i emisyjne są zawarte w zakresie bliskiej podczerwieni. Dodatkowym wymogiem jest zapewnienie niskiego stopnia toksyczności wykorzystywanego fluoroforu. Barwnikiem spełniającym te kryteria jest zieleni indocyjaninowa (ICG), która jest preparatem o niskiej toksyczności stosowanym w niektórych procedurach medycznych i może być wykorzystywana do celów diagnostycznych u ludzi [58].

W badaniach u ludzi wykazano możliwość wykorzystania ICG w ocenie nowotworów sutka, przy czym zaobserwowano zgodność obrazów uzyskanych metodą optycznej tomografii dyfuzyjnej i obrazowaniem MRI [59]. Wstępnie wykazano możliwość detekcji na powierzchni głowy światła fluorescencyjnego wzbudzonego barwnika – zieleni indocyjaninowej po jej dożylnym wstrzyknięciu i podczas napływu do mózgu [60]. Wykorzystanie efektu przenikania barwnika do przestrzeni zewnątrznaczyniowej może pozwolić na ocenę zaburzeń bariery krew-mózg, wywołanych np. udarem mózgu [Steinbrink, Liebert i inni 2008].

Znaczniki optyczne

Znaczniki biooptyczne można podzielić na wykorzystujące zjawisko bioluminescencji samoistnej lub wywoływanej czynnikiem biochemicznym (np. obecnością danej molekuly) oraz oparte na zjawisku fluorescencji, czyli emisji światła pod wpływem napromieniowania światłem o nieco krótszej długości fali [62]. Współcześnie dostępne fluorofory są wzbudzane światłem z zakresu UV i pasma widzialnego, a emitują światło fluorescencyjne.

scencyjne w zakresie widzialnym i bliskiej podczerwieni [4]. W przypadku bioluminescencji powszechnie wykorzystuje się świecące białko, np. lucyferazę i pochodne [63, 64]. Istnieje wiele sposobów na wprowadzenie tego białka do organizmu, jego aktywację i dezaktywację z wykorzystaniem kinaz, w tym enzymów oraz ich ekspresji z genów raportujących – znacznikowych [65, 66].

Przeprowadzone w latach 60. studia nad fluoryzującą meduzą *Aequorea victoria* pozwoliły wyodrębnić akworynę – białko emitujące światło, oraz w późniejszym okresie białko GFP (*green fluorescent protein*). W ciele meduzy błękitne światło emitowane przez akworynę było pochłaniane i wzbudzało GFP, skutkując zieloną fluorescencją organizmu. To odkrycie zostało uhonorowane w 2008 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Dalsze badania doprowadziły do wyodrębnienia wielu innych fluoryzujących białek, a nowoczesne techniki biotechnologiczne pozwalają łączyć je z większością molekuł i komórek. Dostępne dziś fluorofory obejmują kilka tysięcy wyspecjalizowanych barwników. Barwniki te charakteryzują się wysokimi wartościami jasności [67].

Bardzo obiecujące są znaczniki wielofunkcyjne, umożliwiające jednocześnie obrazowanie w różnych trybach (np. PET, MR i bioluminescencyjnie). Pozwalają one na śledzenie pracy systemu immunologicznego *in vivo* oraz ilościowe obrazowanie oddziaływań komórkowo-molekularnych i ekspresji genów [68]. Inną nową grupą znaczników są inteligentne sondy. Aktywują się one w momencie, gdy zachodzi pewien rodzaj oddziaływań lub pojawia się w pobliżu określona molekula, np. enzym, lub komórka. Pozwalają na selektywne obrazowanie wybranych obiektów. Ponieważ do momentu aktywacji znacznik nie wykazuje fluorescencji, to jego wykorzystanie pozwala na obrazowanie bez sygnału z tkanek pobocznych w stosunku do znakowanego obiektu, co skutkuje wysokim kontrastem uzyskanego obrazu i większą dokładnością przestrzenną [47].

Istotnym problemem jest toksyczność stosowanych znaczników fluorescencyjnych. Niestety w przypadku wielu barwników fluorescencyjnych informacje o ich toksyczności są bardzo ograniczone. W praktyce problem toksyczności znaczników powoduje, że metody optyczne są stosowane głównie w eksperymentach na zwierzętach doświadczalnych. Jedynym barwnikiem, wykazującym fluorescencję w zakresie bliskiej podczerwieni i dopuszczonym obecnie do zastosowań klinicznych u ludzi, jest zieleń indocyaninowa [58, 69, 70].

Podsumowanie

Przedstawiono przegląd nowoczesnych metod obrazowania optycznego stosowanych w skali mikroskopowej oraz w organizmach małych zwierząt doświadczalnych. Techniki te pozwalają na ocenę zjawisk zachodzących w tkankach i komórkach dzięki zastosowaniu sond-znaczników, które selektywnie wiążą się z elementami struktury komórki bądź struktury tkankowej. Wykorzystanie metod obrazowania optycznego pozwala na dynamiczne monitorowanie napływu i klirensu znaczników oraz ocenę ich farmakokinetyki. Techniki te już obecnie pozwalają na ocenę efektywności nowych leków i metod terapeutycznych oraz na pogłębione rozumienie zjawisk patologicznych na poziomie molekularnym. Wraz z rozwojem genomiki i proteomiki konieczne będzie poszukiwanie nowych znaczników i środków do obrazowania, a w szczególności metod pozwalających na obrazowanie ilościowe [63, 71].

Techniki optyczne stosowane u ludzi *in vivo* mogą pozwolić na uproszczenie procedur diagnostycznych. Mogą one znaleźć zastosowanie w szczególności w badaniach zmian nowotworowych [59] oraz w badaniach uszkodzeń bariery krew-mózg [61]. Postęp w tej dziedzinie jest uależniony w szczególności od rozwoju nowych, nietoksycznych barwników o wysokiej wydajności kwantowej oraz czułych systemów detekcji promieniowania świetlnego. ■

Literatura

1. C.S. Levin: *Primer on molecular imaging technology*, Eur J Nucl Med Mol Imaging vol. 2, 2005, s. 325-345.
2. J. Bil, M. Winiarska: *Molekularne mechanizmy aktywności terapeutycznej rytuksymabu, przeciwciała monoklonalnego anty-CD20*, Postępy biologii komórki 34, vol. 2, 2007, s. 335-359.
3. T. Sołtysiński: *Targets and strategies for imaging dynamics of molecular-cell interactions in autoimmune disorders*, Molecular Imaging vol. 6, 2007, s. 365.
4. J. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic 1999.
5. R.J. Paul, H. Schneckenburger: *Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy*, Naturwissenschaften, vol. 83, 1996, s. 32-35.
6. R. Buxton: *An introduction to functional magnetic resonance imaging: principles and technics*, Cambridge University Press 2002.
7. J.R. Lakowicz, H. Szmajda, i in.: *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*, Proc Natl Acad Sci USA, vol. 89, 1992, s. 1271-1275.
8. J.P. Knemeyer, N. Marme, i in.: *Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level*, Anal Chem, vol. 72, 2000, s. 3717-3724.
9. H.C. Gerritsen, M. A. Asselbergs, i in.: *Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution*, J Microsc, vol. 206, 2002, s. 218-224.
10. K.M. Hanson, M.J. Behne, i in.: *Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient*, Biophys J, vol. 83, 2002, s. 1682-1690.
11. B. Treanor, P.M. Lanigan, i in.: *Imaging fluorescence lifetime heterogeneity applied to GFP-tagged MHC protein at an immunological synapse*, J Microsc, vol. 217, 2005, s. 36-43.
12. K. König, I. Riemann: *High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution*, J Biomed Opt, vol. 8, 2003, s. 432-439.
13. K. König, A. Ehlers, i in.: *In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography*, Skin Pharmacol Physiol, vol. 19, 2006, s. 78-88.
14. F.G. Blankenberg: *Molecular imaging with single photon emission computed tomography. How new tracers can be employed in the nuclear medicine clinic*, IEEE Eng Med Biol Mag, vol. 23, 2004, s. 51-57.
15. S. Guccione, K.C. Li, i in.: *Molecular imaging and therapy directed at the neovasculature in pathologies. How imaging can be incorporated into vascular-targeted delivery systems to generate active therapeutic agents*, IEEE Eng Med Biol Mag, vol. 23, 2004, s. 50-56.
16. M.G. Pomper, D.A. Hammoud: *Positron emission tomography in molecular imaging. Could the promise of personalized patient care be reaching fruition?*, IEEE Eng Med Biol Mag, vol. 23, 2004, s. 28-37.
17. D. Noll: *A primer on MRI and functional MRI. Technical Report*, University of Michigan, 2001.
18. J.A. Detre, V. H. Subramanian, i in.: *Measurement of regional cerebral blood flow in cat brain using intracarotid 2H_2O and 2H NMR imaging*, Magn. Reson. Med., vol. 14, 1990, s. 389-395.
19. J.A. Detre, J.S. Leigh, i in.: *Perfusion imaging*, Magn Reson Med, vol. 23, 1992, s. 37-45.
20. K.K. Kwong, A.L. Hopkins: *Proton NMR imaging of cerebral blood flow using $H_2(17)O$* , Magn Reson Med, vol. 22, 1992, s. 154-158.
21. J.W. Belliveau, K.K. Kwong, i in.: *Magnetic resonance imaging mapping of brain function. Human visual cortex*, Invest Radiol, vol. 27, 1992, s. 59-65.
22. K.K. Kwong, J.W. Belliveau, i in.: *Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation*, Proc Natl Acad Sci USA, vol. 89, 1992, s. 5675-5679.
23. A. Jasanoff: *Functional MRI using molecular imaging agents*, Trends Neurosci, vol. 28, 2005, s. 120-126.
24. D. Spector, D. Goldman, Eds.: *Basic Methods In Microscopy*, NY, Cold Spring Harbor, 2006.
25. A. Diaspro, P. Bianchini, i in.: *Multi-photon excitation microscopy*, Biomed Eng Online 5, 2006, s. 36.

26. A. Graczyk, (red.): *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, 1999.
27. W. Becker: *Advanced Time-Correlated Single Proton Counting Techniques*, Springer, 2005.
28. K.M. Berland: *Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions*, *Methods Mol Biol*, vol. 261, 2004, s. 383-398.
29. E.M. SevickMuraca, G. Lopez, i in. : *Fluorescence and absorption contrast mechanisms for biomedical optical imaging using frequency-domain techniques*, *Photochemistry And Photobiology*, vol. 66, 1997, s. 55-64.
30. E.M. Sevick-Muraca, J.S. Reynolds, i in. : *Fluorescence lifetime imaging of tissue volumes using near- infrared frequency domain photon migration*, *Photochemistry And Photobiology*, vol. 69, 1999, s. 66-66.
31. K. Suhling: *Fluorescence life time imaging. Cell imaging*, D. Stephens, Scion Publishing 2006.
32. J.R. Lakowicz, I. Gryczynski, i in. : *Correction for incomplete labeling in the measurement of distance distributions by frequency-domain fluorometry*, *Anal Biochem*, vol. 195, 1991, s. 243-254.
33. W. Bayens, D. de Keukeleire, i in. : *Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis*, New York 1991.
34. R.M. Andersson, K. Carlsson, i in. : *Characterization of probe binding and comparison of its influence on fluorescence lifetime of two pH-sensitive benzo[c]xanthene dyes using intensity-modulated multiple-wavelength scanning technique*, *Anal Biochem*, vol. 283, 2001, s. 104-110.
35. K. Carlsson, A. Liljeborg, i in. : *Confocal pH imaging of microscopic specimens using fluorescence lifetimes and phase fluorometry: influence of parameter choice on system performance*, *J Microsc*, vol. 199, 2000, s. 106-114.
36. R. Varma, S. Mayor: *Homo-FRET measurements to investigate molecular-scale organization of preteins in living cells. Cell imaging*, D. Stephens, Scion Publishing 2006.
37. K.M. Berland, P.T. So, i in. : *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment*, *Biophys J*, vol. 68, 1995, s. 694-701.
38. K.M. Berland: *Fluorescence correlation spectroscopy: new methods for detecting molecular associations*, *Biophys J*, vol. 72, 1997, s. 1487-1488.
39. K. Berland, G. Shen: *Excitation saturation in two-photon fluorescence correlation spectroscopy*, *Appl Opt*, vol. 42, 2003, s. 5566-5576.
40. R.H. Kohler, P. Schwille, i in. : *Active protein transport through plastid tubules: velocity quantified by fluorescence correlation spectroscopy*, *J Cell Sci*, vol. 113, 2000, s. 3921-3930.
41. M.A. Medina, P. Schwille: *Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology*, *Bioessays*, vol. 24, 2000, s. 758-764.
42. O.A. Mayboroda, A. van Remoortere, i in. : *A new approach for fluorescence correlation spectroscopy (FCS) based immunoassays*, *J Biotechnol*, vol. 107, 2004, s. 185-192.
43. D. Zenisek: *Total internal reflection fluorescence microscopy. Cell imaging*, D. Stephens, Scion Publishing 2006.
44. E.M. Hillman, A. Devor, i in. : *Depth-resolved optical imaging and microscopy of vascular compartment dynamics during somatosensory stimulation*, *Neuroimage* vol. 35, 2007, s. 89-104.
45. S.A. Burgess, M.B. Bouchard, i in. : *Simultaneous multiwavelength laminar optical tomography*, *Opt Lett*, vol. 33, 2008, s. 2710-2712.
46. R. Weissleder, U. Mahmood: *Molecular imaging*, *Radiology*, vol. 219, 2001, s. 316-333.
47. R. Weissleder, C.H. Tung, i in. : *In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes*, *Nature Biotechnology*, vol. 17, 1999, s. 375-378.
48. R. Weissleder, V. Ntziachristos: *Shedding light onto live molecular targets*, *Nat Med* vol. 9, 2003, s. 123-128.
49. V. Ntziachristos, R. Weissleder: *Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media*, *Med Phys*, vol. 29, 2002, s. 803-809.
50. V. Ntziachristos, R. Weissleder: *Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation*, *Optics Letters*, vol. 26, 2001, s. 893-895.
51. V. Ntziachristos, C. Bremer, i in. : *In vivo tomographic imaging of near-infrared fluorescent probes*, *Mol Imaging*, vol. 1, 2002, s. 82-88.
52. R. Weissleder: *Scaling down imaging: Molecular mapping of cancer in mice*, *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, 2002, s. 11-18.
53. E.M. Hillman, A. Moore: *All-optical anatomical co-registration for molecular imaging of small animals using dynamic contrast*, *Nat Photonics*, vol. 1, s. 526-530.
54. S. Wray, M. Cope, i in. : *Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation*, *Biochim Biophys Acta*, vol. 933, 1988, s. 184-192.
55. V. Ntziachristos, J. Ripoll, i in. : *Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies?*, *Optics Letters*, vol. 27, 2002, s. 1652-1652.
56. E.M. Sevick-Muraca, J.P. Houston, i in. : *Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents*, *Curr Opin Chem Biol*, vol. 6, 2002, s. 642-650.
57. J.S. Reynolds, T.L. Troy, i in. : *Imaging of spontaneous canine mammary tumors using fluorescent contrast agents*, *Photochem Photobiol*, vol. 70, 1999, s. 87-94.
58. T. Desmettre, J.M. Devoisselle, i in. : *Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography*, *Surv Ophthalmol*, vol. 45, 2000, s. 15-27.
59. A. Corlu, R. Choe, i in. : *Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans*, *Optics Express*, vol. 15, 2007, s. 6696-6716.
60. A. Liebert, H. Wabnitz, i in. : *Non-invasive detection of fluorescence from exogenous chromophores in the adult human brain*, *Neuroimage*, vol. 31, 2006, s. 600-608.
61. J. Steinbrink, A. Liebert, i in. : *Towards noninvasive molecular fluorescence imaging of the human brain*, *Neurodegener Dis*, vol. 5, 2008, s. 296-303.
62. C. Bremer, V. Ntziachristos, i in. : *Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications*, *Eur Radiol*, vol. 13, 2003, s. 231-243.
63. J. Hardy, M. Edinger, i in. : *Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo*, *Exp Hematol*, vol. 29, 2001, s. 1353-1360.
64. K.E. Luker, M.C. Smith, i in. : *Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals*, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, 2004, s. 12288-12293.
65. G.D. Luker, J.P. Bardill, i in. : *Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice*, *J Virol*, vol. 76, 2002, s. 12149-12161.
66. G.D. Luker, V. Sharma, i in. : *Noninvasive imaging of protein-protein interactions in living animals*, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, 2002, s. 6961-6966.
67. R.N. Day, F. Schaufe: *Fluorescent protein tools for studying protein dynamics in living cells: a review*, *J Biomed Opt*, vol. 13, 2008, s. 031202.
68. A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, i in. : *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*, *Nature*, vol. 403, 2000, s. 503-511.
69. M. Hope-Ross, L.A. Yannuzzi, i in. : *Adverse reactions due to indocyanine green*, *Ophthalmology*, vol. 101, 1994, s. 529-533.
70. S. Mordon, J.M. Devoisselle, i in. : *Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo*, *Microvasc Res*, vol. 55, 1998, s. 146-152.
71. C.J. Shu, S. Guo, i in. : *Visualization of a primary anti-tumor immune response by positron emission tomography*, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 102, 2005, s. 17412-17417.

otrzymano / received: 01.12.2008 r.
zaakceptowano / accepted: 16.12.2008 r.