

Dobrodružství mikroskopie – cesta ke třetí dimenzi

Od dob, kdy Holanďan Antoni van Leeuwenhoek popisoval britské Královské společnosti svá první pozorování mikrosvětla, zprostředkovaná vlastnoručně vyrobeným drobnohledem, již uplynulo skoro 350 let. Jeho následovníkům se postupně dařilo posouvat hranice viditelného a konstruovat mnohem dokonalejší mikroskopy. A to nejenom světelné, ale i elektronové. Když se zdálo, že není kam pokročit, byly vyvinuty na základě složitých matematických algoritmů zobrazovací techniky, které na jednu stranu využívají, na druhou obcházejí netriviální fyzikální zákonitosti. S narůstající touhou po dalším poznání byl vyvinut nespočet chemických látek umožňujících rozsvítit specifické molekuly zářivým světlem fluorescence. Přibýly také účinné zdroje částic pronikajících skrz živé tkáně i zkamenělá těla dávnou vyhnulých organismů. Moderní detektory pak dokázaly zachytit i ten nejmenší pozitivní signál různé povahy. Novinkou poslední doby jsou sofistikované přístroje skládající virtuální řezy z nitra pozorovaných objektů do celistvých trojrozměrných modelů, aniž by bylo nutné jakkoli porušit jejich integritu.

První krůčky mikroskopie

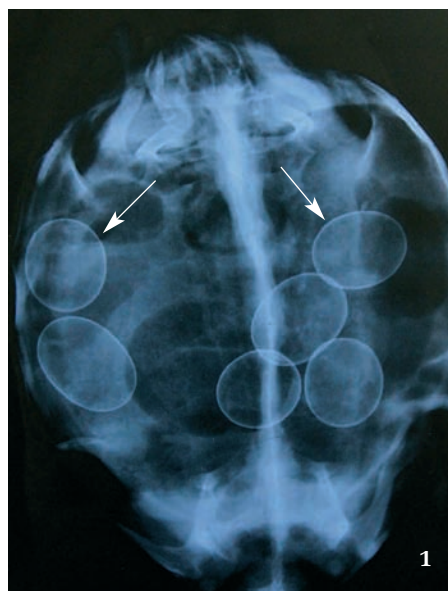
Skrutý mikrosvět zůstával našim očím utajený až do té doby, kdy lidé pohlédli do primitivních drobnohledů a zprostředkovali svá pozorování tzv. animacul (drobných „zvířátek“) zbytku světa na zdařilých kresbách. Nad přesností těchto uměleckých děl s vysokou výpovědní hodnotou často žasneme i v dnešní době citlivých kamer napojených na současné složité mikroskopy, které ty původní nepřipomínají ani z dálky (viz obr. 1 na str. CLXII kulérové přílohy této Živy).

Zobrazovací techniky však pokročily ještě dál a některé z nich se od původních priorit dosáhnout co nejvyššího rozlišení a čistého obrazu bez rušivých optických jevů přesunuly jinam. Mimo jiné k možnostem, jak probádat nitro objektů bez toho, abychom je museli nejdříve zničit. Tedy – definitivně se rozloučit s jejich původní celistvostí a doslova je „vypítvat“ nebo rozkrájet na tenké histologické řezy, z nichž by se pak dal zpětně sestavit trojrozměrný (3D) model původního uspořádání. Takové metody neinvazivního 3D zobrazování jsou často založené na zcela jiných principech než světelná či elektronová mikroskopie, o nichž blíže pojednává článek v kuléru tohoto čísla (na str. CLXII–CLXV) a k němuž se vážou i pracovní listy na webových stránkách Živy.

Cesta k novému rozměru

Se základním přístupem, jak nahlédnout dovnitř živého organismu bez trvalého zásahu, se setkal každý z nás. Zmíněnou definici totiž splňuje i „obyčejný“ rentgen, jenž vysílá záření snáze prostupující měkkými tkáněmi než např. zvápenatělými kostmi. Jde o princip využíváný s úspěchem v humánní i veterinární medicíně

pro diagnostiku poruch zejména tělního skeletu již po desetiletí. V průběhu času přišla ke slovu i kontrastní činidla, která po perorálním podání umožňují na rentgenu odhalit neprůchodnost trávicí soustavy, poruchy celistvosti dutinových orgánů nebo po aplikaci do míšního kanálu třeba i místo vyřeznutí meziobratlové ploténky. Takových kontrastních činidel používaných v lékařství existuje celá řada (obvykle jde o sloučeniny jódu nebo baria), v některých případech může dobře posloužit i pouhé vyplnění vodou nebo vzduchem. Kontrastní látky mají společné, že díky míře absorpce rentgenového záření jsou na finálním snímku viditelné a snadno odlišitelné od okolních tkání. A co je důležitější: pro příjemce, tedy lidského nebo zvířecího pacienta jsou netoxické (obr. 1).



I tak obecně rozšířená metoda „pronikání pod povrch“ jako rentgen však má své limity. Nedokáže např. poskytnout informaci ve třetím rozměru (3D), ačkoli tuto nevýhodu do jisté míry nahrazuje rutinní pořizování snímků z více úhlů (často v kombinaci předozadní a boční projekce). Z nich umí zkušený hodnotitel (radiodiagnostik) vyčíst relativně přesnou polohu konkrétních sledovaných útvarů, ačkoli se na snímcích překrývají se strukturami, které se při dané projekci nacházejí nad nebo pod nimi.

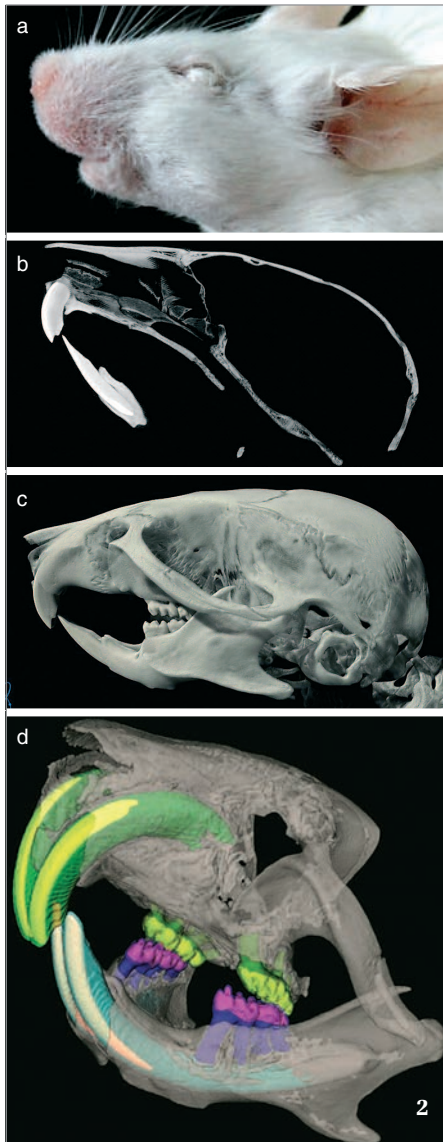
Pro rekonstrukci 3D obrazu v pravém smyslu slova však musíme objekt nasnímat z mnohem většího počtu úhlů. Poptávka dala nakonec vzniknout přístroji, známému pod zlidovělým názvem „cétéčko“ neboli CT, podle zkratky z anglického Computed Tomography. Česky lze říci výpočetní tomografie, ačkoli více vžitý je nesprávný výraz počítačová tomografie. Také tento přístroj pracuje s rentgenovým zářením, tentokrát ale v kombinaci s otáčecím mechanismem umístěným kolem zkoumaného objektu. Na jedné straně zdroj vysílá rentgenové záření a na druhé detektor v rychlém sledu zachycuje a zaznamenává intenzitu paprsků poté, co prošly objektem (typicky tělem pacienta) nacházejícím se mezi nimi. Postupným otáčením protistojné soustavy zdroj – detektor vzniká série často až několika set snímků, tzv. projekcí, zachycujících objekt v rentgenových paprscích pod různými úhly. Složením celé série pomocí speciálního programu pro obrazovou rekonstrukci pak vzniká 3D výstup, ve kterém se můžeme ve virtuálním prostředí pohybovat a neinvazivně doslova „prokrajovat“ objekt našeho zájmu v libovolných rovinách bez jeho skutečného poškození. Stejně jako u klasického rentgenu i zde je možné využít různá kontrastní činidla, jejichž podání usnadní zobrazení např. při angiografických vyšetřeních cév nebo při vyšetření trávicí soustavy. I tato metoda však má limity. Hlavním omezením je škodlivost rentgenového záření pro živé organismy, které se může při dlouhodobém či opakovaném snímkování negativně projevit. Při skenování neživých objektů ale zmíněné faktory omezení nepředstavují. Výsledkem rekonstrukcí z takto intenzivního snímání často bývá kvalitnější výstup ve větším rozlišení, a tak se výpočetní tomografie s oblibou využívá nejen v medicíně, ale i v ostatních biologických oborech. Nezapomenutelné místo má také v materiálových vědách a v dalších technických aplikacích, ty však pro účely našeho článku pomineme.

3D v medicíně

Pro trojrozměrné zobrazování vnitřních orgánů se v současné humánní medicíně používá rutinně hned několik metod, které se od sebe v principu značně liší, i když laikovi často splývají v jedinou (také v Živě 2007, 6: 285–288). Kromě CT, jehož princip i uplatnění jsme vysvětlili výše, sem patří metoda MRI využívaná zejména v kardiologii, neurologii a onkologii. Zkratka je odvozena z anglického Magnetic Resonance Imaging. Ačkoli výstupy v podobě virtuálních průřezů tělem nebo 3D modelů sledovaných orgánů se na první pohled velmi podobají těm z CT, fungu-

1 Rentgenový snímek, pomocí něhož bylo možné v těle dospělé samice želvy pardálí (*Stigmochelys pardalis*) odhalit i přes vrstvu pevného kostěného krunýře přítomnost několika kulatých útvarů – vajíček (dvě z nich označena šipkou), která se jí nepodařilo vyklást přirozenou cestou. Foto: L. Nečasová a J. Cukr, Veterinární klinika Na Hrádku

2 Osteologická analýza lebek (na snímku laboratorní myš) může v přístrojích pro mikroCT (blíže v textu) probíhat bez předchozího odstraňování měkkých tkání usmrčených zvířat, což je nedočetelný nástroj využívaný zejména v muzeích (obr. a). Rekonstrukce jednoho z bočních tomografických řezů (b) použitých pro následné složení výsledného 3D modelu lebky (c). Tento model lze ve speciálních programech dále upravovat, analyzovat a otáčet. Zubní aparát na prostorovém 3D modelu s barevným zvýrazněním jednotlivých složek zubů horní a dolní čelisti (d). U horní čelisti je sklovina zubů kolorována žlutě a dentin zeleně, u dolní čelisti sklovina řezáků bíle, sklovina stoliček fialově, dentin řezáků světle modře a dentin stoliček tmavě modře. Poloprůhledné zobrazení lebečních kostí umožňuje vidět kořeny zubů zasahujících do čelisti. Obr. b–d byly nasnímány na přístroji Skyscan 1176 (Bruker), výsledné zobrazení v podobě rekonstruovaného virtuálního řezu (b), resp. na základě rekonstrukcí virtuálních řezů (c a d) pak vzniklo v programu CTvox (Bruker), barevný 3D model (d) byl konstruován z těchto řezů ve volně dostupném programu ITK-Snap (www.itksnap.org). Foto: J. Bulantová (a) a F. Špoutil (b–d), České centrum pro fenogenomiku na Ústavu molekulární genetiky AV ČR při centru BIOCEV



je MRI jinak. Jejím principem je detekce napětí jader atomů, odlišného pro různé tkáně, indukovaného v přítomnosti silného magnetického pole. Výhodu oproti CT představuje absence nežádoucího ozáření. Vzhledem k silnému magnetickému poli, v němž se člověk nachází po celou dobu vyšetření, je však MRI zapovězena pacientům s kovovými náhradami nebo implantáty (typicky s kardiostimulátory). Podobně jako při CT lze zvýraznit některé struktury pomocí kontrastní látky, v případě MRI nitrožilním podáním feromagnetického prvku, obvykle gadolinia. Třetím zástupcem nejčastějších zobrazovacích technik využívaných v lékařství se stala metoda označovaná zkratkou PET, opět z anglického Positron Emission Tomography. Je založená na nitrožilním podání radioaktivních látek (radiofarmak) s krátkým poločasem rozpadu, během kterého vznikají pozitrony (izotopy). V těle pacienta pak reagují s elektrony za vzniku dvojice fotonů, jejichž pozici následně zachytí detektory rozmístěné v prstenci kolem pacientova těla. Nejčastějším radiofarmakem je sloučenina 18-fluorodeoxyglukóza (18F-FDG), která se chová jako běžná glukóza. Díky tomu je v těle pacienta distribuována do tkání s vyšší rychlostí metabolismu, což se využívá především při zobrazování nádorových buněk (viz Živa 2013, 5: 202–205). V případě, že je radio-

aktivně označena jiná látka (např. léčivo), lze touto metodou efektivně studovat i farmakokinetiku (jakým způsobem látka prochází organismem v čase od podání až k vyloučení) nebo farmakodynamiku (zkoumající mechanismus působení látky a také závislost jejího množství a účinku konkrétních molekul).

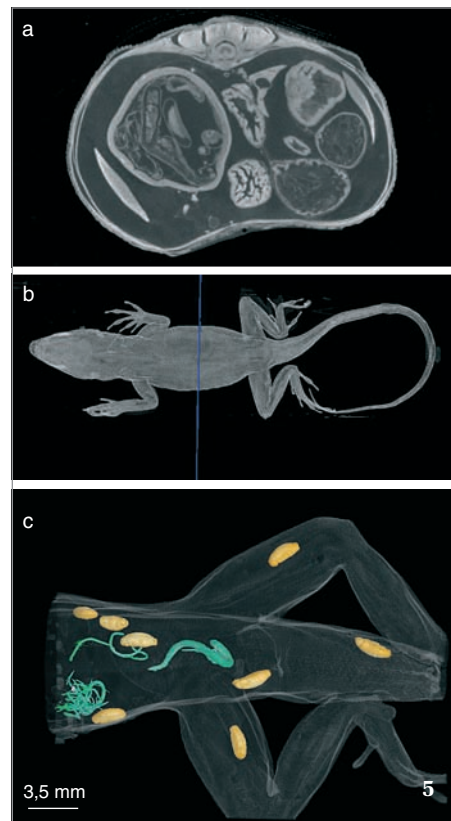
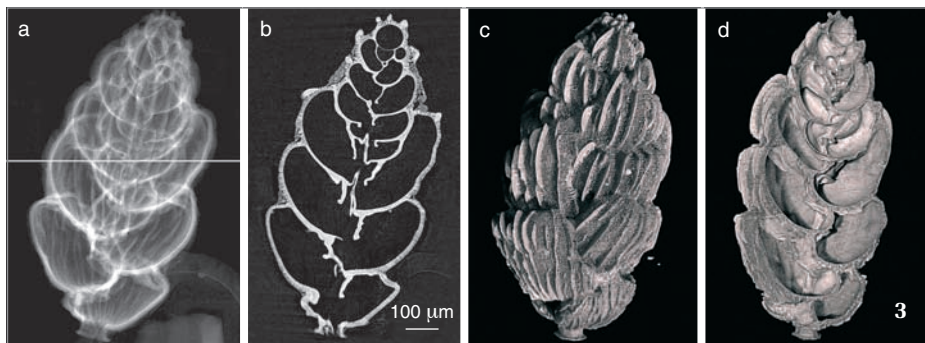
3D ve vědě

Popisované technologie 3D zobrazovacích metod nacházejí využití také v preklinickém nebo základním výzkumu. Často jde o modifikované přístroje překonávající limity rozlišení na úrovni jednotlivých buněk, nebo dokonce buněčných struktur. Přinesly revoluci v různých oblastech přírodních věd, včetně medicínského výzkumu, který hojně využívá modelové organismy, typicky laboratorní myši. Zpravidla tomu odpovídá také celková velikost i konstrukce přístrojů, které se od těch určených pro člověka a umístěných na radiologických odděleních nemocnic značně liší. Nejvíce velikostí prostoru pro skenovaný objekt, u CT pak i tím, že se v přístroji neotáčí zdroj záření s detektorem kolem objektu, ale objekt samotný, zatímco zdroj a detektor zůstávají na místě. Přesto jde stále o přístroje, které vzhledem k vysokým pořizovacím i provozním nákladům a specifickému využití většina laboratoří sama nevládní. Využívají se proto spí-

še formou spolupráce se specializovanými zobrazovacími centry, poskytujícími služby za adekvátní finanční příspěvek i jiným institucím, případně se podílí na řešení společných mezioborových projektů. Navázání takové spolupráce bývá často zajímavé pro obě strany, a proto vznikl projekt sdružující zobrazovací centra z Čech, případně z celé Evropy s různými typy přístrojů, která lze v případě zájmu oslovit (www.czech-bioimaging.cz, www.euro-bioimaging.eu).

V základním biologickém výzkumu se pro 3D zobrazování nejčastěji využívá CT, konkrétně pak mikroCT, jehož výstupy dosahují rozlišení až na úrovni mikrometrů. Tyto přístroje se např. velmi osvědčily v přírodovědných muzeích. V žádném muzeu totiž většinou nechybějí osteologické sbírky, zaměřené především na lebky, které stavbou dokonale dokumentují způsob života a získávání potravy svých původních majitelů, navíc nesou druhově specifické znaky. Způsob, jakým se lebky preparují, je však poměrně zdoluhavý a mnohdy při něm hrozí ztráta nebo poničení drobných křehkých kostí, hlavně u lebek ryb nebo menších druhů obratlovců. Pokud jde navíc o zvíře, které není z jakéhokoli důvodu dostupné ve více exemplářích, vzniká velké dilema. V takovém případě totiž není žádoucí, aby byly měkké tkáně okolo kostí zničeny na úkor preparace kosterního materiálu. Osteologické parametry zkoumaného jedince pak zůstávají pro další studium nedostupné nebo se omezují na rentgenový snímek. Právě tato dilemata pomohla dokonale vyřešit metoda mikroCT. Skutečnost, že jde o neživý a nepohyblivý objekt, nabízí možnost prodloužit čas i navýšit energii použitou ke skenování bez negativních důsledků pro zdraví studovaného organismu. Lze tak získat dokonalý 3D model lebky nebo celé kostry zvířete a dál ho vyhodnocovat z hlediska hustoty kostní tkáně, objemu např. očníce nebo mozkovny, struktury vnitřního ucha (za normálních okolností ukrytého uvnitř lebky), masivnosti jednotlivých kostí nebo tvrdosti materiálů, kterými jsou tvořeny třeba zuby. Vše prostým naskenováním mrtvého fixovaného jedince a následným složením dat ze snímkování ve speciálním programu. A to bez stahování kůže, rizika poničení svalových úponů a vnitřních orgánů nežádoucí nadbytečnou manipulací (obr. 2).

Podobně bylo 3D zobrazovacích metod využito i pro studium archeologických nálezů zachovalých ostatků lidí, včetně mumii. Svě místo si však našlo zejména mikroCT, a to na poli paleontologie. Představme si např. zkamenělinu nebo ještě lépe jantar, v němž před desítkami až stovkami milionů let uvízly plody, semena či pylová zrna rostlin, těla bezobratlých nebo dokonce drobných obratlovců. Jak ale prozkoumat vnitřní podobu těchto objektů, abychom vzácný nález zachovali pro další studium? Odpověď nabízí mimo jiné právě již zmiňované mikroCT, pomocí něhož získáme nejen topografický model v jantaru uvězněného mravence nebo brouka, ale i údaje o velikosti a umístění svaloviny a orgánů uvnitř jejich těla (viz také články v Živě 2014, 5: 198–202 a 2008, 6: 286–288).



Podobným způsobem lze zaznamenávat např. vnitřní uspořádání schránek dírkonošců, a to jak fosilních, tak současných (obr. 3 a 4).

Jeden z problémů, který bylo potřeba vyřešit při 3D zobrazování metodami založenými na rentgenovém záření, představuje zobrazování měkkých tkání. Jejich signál bývá totiž často doslova „přehlušen“ signálem z tvrdých tkání, jako jsou zvápenaté kosti obratlovců, chitinové části vnější kostry bezobratlých nebo schránky, jež organismy obklopují či uzavírají v sobě. Částečně se s ním lze vypořádat pomocí citlivosti moderních přístrojů a jejich schopnosti odfiltrovat určitou intenzitu signálu. Velký podíl na překonání tohoto limitu však měly i látky, jimiž lze tělo studovaného organismu prosytit, a tím kontrast jednotlivých orgánů výrazně zvýšit. Při využití těchto kontrastních činidel, zmíněných již v odstavci o rentgenu a o medicínském využití 3D zobrazovacích metod, se však nevyhneme omezením, která souvisejí s toxicitou takových látek pro vše živé. U mrtvých a fixovaných biologických objektů se ale spektrum efektivně využitelných látek rozrůstá. Jako kontrastní činidla lze s úspěchem využít např. chemikálie, jako jsou kyselina fosfowolframová nebo fosfomolybdenová. K nejpoužívanějším však patří opět sloučeniny jódu, tentokrát však v mnohem vyšších koncentracích oproti organismům snímáním zaživa. Běžně se tak provádí prosvěcování objektů dobře známým Lugolovým roztokem. Díky takto účinnému kontrastování pak můžeme lépe odečíst nejen velikost a uspořádání měkkých tkání uvnitř těla, ale i možných parazitů přítomných v parenchymu nebo v dutinách vnitřních orgánů (obr. 5).

Různé cesty ke stejnému cíli

Zobrazovací techniky umožňující pozorování objektů ve vysokém rozlišení ve 3D zažívají v posledních letech obrovský rozmach. Díky zájmu vědců a technologického pokroku se přístroje dále zdokonalují a objevují se pro ně stále nová využití. Na vybraných příkladech zřejmě nejrozšířenější metody CT, případně mikroCT jsme se snažili představit alespoň ty nejzajímavější ze základních aplikací. Závěrem je však třeba upozornit, že CT i ostatní 3D zobrazovací metody mají mnohem širší uplatnění. Stejně tak je vhodné zmínit, že kromě zde jmenovaných 3D zobrazovacích metod sloužících zejména v klinické praxi, preklinickém výzkumu, v biologických, ale i technických oborech existují další, neméně zajímavé technologie, které se omezují „pouze“ na oblast výzkumnou a nebylo možné je z prostorových důvodů do článku zařadit.

Obrovský význam popisovaných metod pro vědu i medicínu je však jasně patrný. Dokazuje to i několik Nobelových cen udělených v souvislosti se zobrazovacími metodami. Každá z technik má pro vědce dychtícího po poznání výhody i omezení, které mohou bádání usnadnit nebo naopak zkomplikovat. Důležité je proto umět se v nich orientovat a zvolit pro nalezení požadovaných odpovědí ten správný nástroj.

Obrazová dokumentace k článku pochází z pracovišť v České republice i mimo ni, která 3D zobrazovací techniky ve velké míře používají. Děkujeme proto všem kolegům jak za zprostředkování, tak za laskavé poskytnutí fotografií.

3 a 4 Výpočetní tomografie (Computed Tomography, CT) je založena na získání početné sady radiografických projekcí zachycujících zkoumaný vzorek z různých úhlů (obr. 3a). V případě prezentovaného dírkonošce *Pappina brevipiformis* (Foraminifera) z Děvínské Nové Vsi poskytnutého K. Holcovou byla zvlášť snímána spodní a horní polovina. Matematickou rekonstrukcí byla následně získána sada tomografických řezů (b) tvořící 3D voxelový model objektu, kde je vidět členitost povrchu (c) i vnitřních struktur (d). Vzorek byl snímán na přístroji konstruovaném v mikroCT laboratoři Ústavu technické a experimentální fyziky ČVUT v Praze (4, blíže na webové stránce Živý; o metodě viz také Živa 2008, 6: 286–288).
Foto: J. Dudák a J. Žemlička

5 Rekonstruovaný příčný tomografický řez tělem drobného ještěra anolise *Anolis sagrei* (obr. a) a vyznačení pozice, z níž řez pochází (b). Ve hřbetní části je vidět průřez obratli a zádovou svalovinou, po stranách části žeber a ve středu jsou patrné většinou průřezy trávicí soustavou vyplněnou natrávenou potravou a hlísticemi zvýrazněnými na kolorovaném 3D modelu zadní části těla *A. sagrei* (c). Bez pitvy odhaluje přítomnost a individuální pozici různých druhů parazitů v těle hostitele. Žluté jsou zvýrazněna larvální stadia vrtejšů (*Acanthocephala*) v podkoží, tělní dutině a svalovině, zeleně pak těla parazitických hlístic uvnitř trávicí soustavy. Ke zvýšení kontrastu byl použit Lugolův roztok obsahující jód a skenování probíhalo na přístroji Phoenix VTomeX M CT na University of Florida. Orig. D. C. Blackburn a E. L. Stanley, Division of Herpetology, Florida Museum of Natural History, Gainesville, Florida