KOSMOS 1992, 40 (1): 123-140

PAWEŁ POMORSKI

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Warszawa

W POSZUKIWANIU MIKROSKOPU IDEALNEGO — RZECZ O MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

Mikroskopia towarzyszy biologii od samego początku jej historii. Znaczenie obserwacji mikroskopowej jest odbiciem nierozerwalnego związku pomiędzy strukturą a funkcją elementów żywej materii. Wraz z rozwojem nauki i techniki pojawiały się nowe mikroskopy, począwszy od elektronowego, a skończywszy na mikroskopie tunelowym. Jednak dziś, po niemal trzystu latach, znaczenie mikroskopii optycznej nie tylko nie zmalało, ale w ostatnich piętnastu, dwudziestu latach przeżywa ona prawdziwy renesans.

Mikroskop pojawił się jako narzędzie do obserwacji niewidocznych gołym okiem struktur organizmu żywego. Jednak zarówno konstrukcja mikroskopu, jak i budowa większości organizmów, posiadały cechy czyniące z niego narzędzie niedoskonałe. Z jednej strony, mikroskop optyczny ma nieprzekraczalną zdolność rozdzielczą, nie jesteśmy więc w stanie dojrzeć obiektów mniejszych niż połowa długości fali światła oświetlającego preparat. Z drugiej strony, większość struktur biologicznych jest przezroczysta dla światła widzialnego i z tego powodu niewidoczna w mikroskopie. Z drugim problemem radzono sobie tworząc niezliczone procedury barwienia, ale wszystkie one były stosunkowo niespecyficzne, w jeszcze większym stopniu zmniejszały zdolność rozdzielczą obserwacji i w większości wymagały pracy z martwym, w znacznym stopniu zmienionym materiałem. Osiągnięcie granic ówczesnych możliwości, w połączeniu ze wzrostem znaczenia technik biochemicznych i pojawieniem się mikroskopu elektronowego, spowodowało, że mikroskop optyczny stawał się powoli przyrzadem pomocniczym.

Dopiero na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych trend ten uległ gwałtownemu odwróceniu. Pojawienie się szeregu nowych metod, z immunocytochemią na czele, spowodowało powrót mikroskopii optycznej do dawnego znaczenia. Spowodowało również burzliwy rozwój nowych konstrukcji mikroskopów, którego ukoronowaniem jest laserowy skanujący mikroskop konfokalny — CLSM (ang. Confocal Laser Scanning Microscope) (rys. 1).

Zasada działania mikroskopu konfokalnego została zgłoszona do biura patentowego w 1957 roku przez Marvina Minsky'ego. Ale dopiero w 1987 roku pojawiły się na rynku jej pierwsze, w pełni zadowalające realizacje. Potrzebne



Rys. 1. Laserowy, skanujący mikroskop konfokalny Phoibos 100 firmy Molecular Dynamics wraz z konsolą sterującego nim komputera Personal Iris firmy Silicon Graphics. A — Moduł optyki konfokalnej, B — moduł sterowania detektorami i laserem, C — Mikroskop optyczny firmy Nikon, D — blok zasilający lampy rtęciowe do klasycznej mikroskopii epifluorescencyjnej i E — konsola komputera

było aż trzydzieści lat rozwoju technologii, aby to, najbardziej chyba zaawansowane technicznie urządzenie wykorzystywane w biologii, ujrzało światło dzienne. Jak pisze S h i n y a I n o u e (1990), "niezwykle rzadko wprowadzenie nowego instrumentu wzbudza takie podniecenie wśród biologów jak w przypadku CLSM". Niewiarygodnie czysty obraz, możliwość wykonywania skrawków optycznych przez grube preparaty, możliwość generowania obrazów będących pionowymi przekrojami przez obserwowany obiekt, tworzenie trojwymiarowych rekonstrukcji o nieosiągalnej dotąd rozdzielczości, czy wreszcie niespotykana dotąd dokładność pomiarów mikrofotometrycznych. To krótkie wyliczenie zalet CLSM tłumaczy dlaczego jest on często postrzegany jako nowy, idealny mikroskop (A m o s 1988; W h i t e i in. 1987).

Niniejszy artykuł ma zapoznać czytelnika z możliwościami oferowanymi przez mikroskopię konfokalną, ale też przedstawić ograniczenia, które są nałożone na tę, tak jak na każdą inną, metodę badawczą. Celem moim jest takie pokazanie tej techniki, by ułatwić ewentualną decyzję o wykorzystaniu CLSM do konkretnych badań w szeroko pojętym zakresie biologii komórki, ze szczególnym zwróceniem uwagi na badania cytoszkieletu i zjawiska lokomocji komórek, co wynika z osobistych zainteresowań autora.

Konstrukcja mikroskopu Minsky'ego była bardzo prosta (Inoue 1990) (rys. 2). Tradycyjny kondensor został zastapiony układem optycznym identycznym jak obiektyw. Pomiędzy źródłem światła a kondensorem, na osi optycznej przyrządu, umieszczono przesłonę o bardzo małym otworze (ang. pinhole). Zmniejszony obraz tej przesłony był rzutowany na preparat przez kondensor. Pole widzenia obiektywu było ograniczone przez druga, bliźniaczą przesłonę umieszczoną symetrycznie do pierwszej i oddzielającej obiektyw do fotodetektora. Tak więc obie przesłony oraz punkt na obserwowanej płaszczyźnie obiektu były umieszczone w ogniskach dwóch układów optycznych, przy czym ognisko znajdujące się w polu obserwacji było wspólne dla obiektywu i kondensora. Przesłony były współogniskowe, czyli konfokalne, z płaszczyzną obserwacji i stad pochodzi nazwa całego układu optycznego. Na skutek takiej konstrukcji, na detektor był rzutowany obraz jednego punktu z jednej płaszczyzny, tym precyzyjniej im mniejsze było światło przesłon. Obrazy punktów leżących poza poziomem ostrości nie były w płaszczyźnie przesłony punktami lecz miały charakter powierzchniowy. W związku z tym większość tworzącego je światła była odcinana i nie docierała do fotodetektora. Jeśli teraz obiekt przesuwano i rejestrowano kolejne stany detektora, możliwe było odtworzenie punkt po punkcie obrazu jednej, wyciętej spośród innych, warstwy preparatu z niespotykaną dotąd czystością obrazu.



Rys. 2. Schemat najprostszego mikroskopu konfokalnego. 1 — źródło światła, 2 — przysłona tworząca plamkę oświetlającą, 3 — kondensor, 4 — obiekt obserwowany, 5 — obiektyw, 6 — przysłona odcinająca światło pochodzące spoza płaszczyzny ostrości, 7 — detektor, a — punkt w preparacie leżący poza płaszczyzną ostrości, b — wiązka światła wychodząca z punktu, a jest zatrzymywana przez przysłonę

Realizacja mikroskopu Minsky'ego napotkała na dwie trudności. Pierwszą była konieczność bardzo dokładnego zestawienia optyki, tak aby kondensor i obiektyw były współogniskowe. problem ten znacznie wzrastał, jeśli chciano zastosować zmienne powiększenie, co wiązało się z koniecznością jednoczesnego zmieniania kondensora i obiektywu. Druga trudność to przesuw preparatu. Dokładność ruchu stolika musiała być porównywalna ze zdolnością rozdzielczą mikroskopu, przy jednoczesnym dużym zasięgu ruchu i praktycznej, czyli niezbyt małej prędkości przesuwu.

Pierwszy problem rozwiązano dość szybko, rezygnując ze światła przecho-

dzącego przez preparat na rzecz konstrukcji mikroskopu z epiiluminacją. W tym systemie oświetlenia obiektyw jest jednocześnie kondensorem, co w sposób naturalny typuje go jako bazę konstrukcyjną dla mikroskopu konfokalnego. Decyzja ta ograniczyła jednak zastosowanie mikroskopii konfokalnej do metod, które wykorzystują epiiluminację, czyli, przede wszystkim do epifluorescencji oraz mikroskopii światła odbitego. Rezygnacja w mikroskopii konfokalnej ze światła przechodzącego nie była wbrew pozorom aż tak bolesna jakby się na pierwszy rzut oka wydawało. Głębia ostrości uzyskiwana w konwencjonalnym mikroskopie wyposażonym w kontrast DIC Nomarskiego jest porównywalna z tą, uzyskiwaną w mikroskopie konfokalnym (I n o u e 1988). Jeśli połączymy w jednym przyrządzie CLSM z kontrastem Nomarskiego, co można zrobić (H o o k i O d e y a l e 1989), to powinniśmy zaspokoić każde wymagania, nawet najwybredniejszego użytkownika.

Drugi problem okazał się dużo trudniejszy. Do dziś nie udało się skonstruować zadowalającego systemu przesuwu stolika, chociaż i tu obserwujemy ogromny postęp. W 1967 roku nastąpiła pierwsza próba obejścia trudności z poruszaniem obiektu przez wprawienie w ruch rzutowanej nań plamki światła. Próby tej dokonał Mojmir Petráň z Pragi konstruując konfokalny mikroskop tandemowy (K i n o 1990). Podstawą tego mikroskopu jest dysk Nipkowa (rys. 3), nazwany tak od nazwiska jego konstruktora Paula Nipkowa, niemieckiego studenta, który zbudował go w roku 1884 jako urządzenie do telegraficznego przekazu obrazu. Przesunięcie dysku o jeden cykl powoduje przejście przed detektorem szeregu otworków odwzorowujących kolejne linie przetwarzanego obrazu. Jeśli na dysku znajduje się jeden zestaw otworów, to cykl jest równy



Rys. 3. Zasada działania dysku Nipkowa. 1 — obraz rzutowany na powierzchnię dysku, 2 — otwór, przez który część światła pochodzącego z obrazu przechodzi w stronę obserwatora, 3 — następny otwór w dysku. Po przejściu otworu 2 przez obraz wejdzie nań otwór 3 i będzie odwzorowywał następna linię

obrotowi dysku, jeśli zestawów jest więcej, to na jeden obrót przypada wiele cykli. Na dysku stosowanym w tandemowym mikroskopie konfokalnym znajduje się parzysta liczba zestawów otworów. Połowa z nich służy jako przesłony dla wiązki oświetlającej, pozostałe - dla światła pochodzącego z preparatu. Przy odpowiednio dużych obrotach dysku uzyskujemy obraz charakterystyczny dla mikroskopu konfokalnego. Nadaje się on do bezpośredniej obserwacji, bez konieczności używania detektora i dalszego przetwarzania sygnału elektronicznego (Boyde i in. 1990; Sheppard i Wilson 1981). Pozwala to na dokonywanie obserwacji w czasie rzeczywistym. Ostatnio Gordon Kino (Kino 1990) z Uniwersytetu w Stanford zmodyfikował tę konstrukcję tak, że wystarczy jeden zestaw otworów, przez które światło przechodzi w obie strony (Wilson+ /1989). Podstawowe problemy, które powstają przy wykorzystaniu dysku Nipokowa w praktyce, to konieczność bardzo dokładnego wykonania samego dysku i jego bardzo precyzyjne ustawienie w wiązce światła, połączone ze znaczną szybkością wirowania. Dysk taki ma około 200 000 precyzyjnie umieszczonych otworów i kręci się z prędkością około 2000 obrotów na minutę. Tak precyzyjna mechanika bardzo podnosi koszty urządzenia. Drugim jeszcze większym problemem jest to, że dysk znacznie redukuje ilość światła, która najpierw pada na preparat, a potem dochodzi do obserwatora. Problemy te spowodowały, że tandemowe mikroskopy konfokalne, mimo swej dwudziestoletniej obecności na rynku, nigdy nie znalazły szerszego zastosowania.

W 1987 roku wszedł na rynek CLSM, który zyskał już dużą popularność i wszystko wkazuje, że jest konstrukcją, która wreszcie zadowoliła użytkowników. Nie jest on wynikiem jakiegoś jednego, genialnego pomysłu, lecz wykorzystuje postęp techniczny, jaki dokonał się ostatnio w różnych dziedzinach od optyki po elektronikę (I n o u e 1990; W i l s o n 1989).

Wyróżniającą cechą CLSM jest zastosowanie lasera jako źródła światła. Wykorzystanie spójnego światła laserowego pozwoliło na rezygnację z przesłony poprzedzającej kondensor. Wiązka światła laserowego może być odchylana i w ten sposób omiata ona pole widzenia tworząc obraz bez konieczności poruszania preparatu. W odróżnieniu od plamki oświetlającej otrzymywanej przy użyciu przesłony, która zatrzymuje znaczną część padającego na nią światła, wiązka lasera ma dużą jasność i daje czyste, jasne obrazy. Po przejściu przez układ odchylający wiązka laserowa trafia na okular, a potem na obiektyw, będący jednocześnie kondensorem. Obiektywy używane w CLSM mają aperturę numeryczną rzędu 1,4, co daje jednocześnie bardzo dużą rozdzielczość i duże pole widzenia (K eller 1990). Dopiero światło powracające z preparatu przez obiektyw jest rzutowane na przesłonę konfokalną i uwolnione przez nią od zakłóceń, pochodzących spoza obserwowanej płaszczyzny, dociera do detektora. Dostępne na rynku konstrukcje pozwalają na jednoczesne wykorzystaroż dwóch detektorów rejestrujących świecenie dwóch barwników (Mossberg i Ericsson 1990).

Zdolność rozdzielcza mikroskopu, rozumiana jako najmniejsza odległość pomiędzy obserwowanymi obiektami, przy której w mikroskopie powstaną ich odrębne obrazy, zależy od dwóch czynników: długości światła i własności optycznych układu. Determinuje ona minimalny rozmiar piksela i wyraża się wzorem:

Zdolność rozdzielcza = $\frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$

gdzie λ — długość światła, n — współczynnik załamania światła substancji w której znajduje się oglądany obiekt, α — połowa kąta widzenia obiektywu.

W mikroskopie konfokalnym równie istotny jest najmniejszy odstęp między kolejnymi skrawkami optycznymi. Wielkość ta ma podobne własności co zdolność rozdzielcza mikroskopu i wyraża się wzorem:

Minimalny odstęp =
$$\frac{1}{2} \times \frac{\lambda}{4 \text{ n sin}^2 \frac{\alpha}{2}}$$

W praktyce można wykorzystać wzory uproszczone:

Zdolność rozdzielcza = $\frac{0.46 \lambda}{N.A.}$ Minimalny odstęp = $\frac{1.4 \eta \lambda}{N.A.^2}$

gdzie N.A. — liczba aperturowa obiektywu. [Wzory uproszczone za Molecular Dynamics]

Integralną częścią takiego mikroskopu jest komputer (rys. 4), który z jednej strony steruje mechaniką odchylania wiązki i pionową pozycją preparatu, z drugiej zaś zbiera obrazy z detektorów i wyświetla je na ekranie. Ten sam komputer pozwala na dalszą obróbkę otrzymanych obrazów, łącznie z tworzeniem rozmaitych projekcji i rekonstrukcji trójwymiarowych.

Wszystko to razem tworzy instrument dość skomplikowany i stosunkowo kosztowny (cena CLSM wynosi powyżej 200 000\$) jednak jego możliwości sprawiają, że staje się coraz powszechniejszy. (Obecnie wiele firm oferuje swoje rozwiązania CLSM. Wszystkie konkretne odniesienia do konstrukcji mikroskopu lub oprogramowania, które czytelnik napotka w dalszej części tego artykułu, będą dotyczyły mikroskopu Phoibos 1000 firmy Molecular Dynamics (dawniej Sarastro).

W praktyce CLSM najczęściej wykorzystuje się jako mikroskop fluorescencyjny. Od tego też zastosowania rozpoczniemy opis jego możliwości. Podstawową metodą mikroskopii fluorescencyjnej (Ploem 1989), stosowaną w biologii, jest immunofluorescencja. Polega ona na znakowaniu poszczególnych białek w komórkach i tkankach za pomocą specyficznych dla nich przeciwciał. Przeciwciała te są sprzęgnięte z barwnikami fluorescencyjnymi,



Rys. 4. Interfejs użytkownika CLSM Phoibos 1000. Widoczne okna tworzone są przez graficzny system operacyjny IRIX, zbliżony do systemu UNIX. Widoczne: A — okno z obrazem, B — okno sterowania mikroskopem, C — okno sterowania programem tworzącym projekcje obrazów trójwymiarowych. D — okno regulacji kontrastu oraz E — zegar

świecacymi światłem wzbudzonym, co pozwala na ich obserwację. Zastosowanie CLSM podnosi jakość otrzymywanych obrazów i pozwala obserwować rozkład barwionego epitopu w trzech wymiarach. W celu określenia tego rozkładu możemy posłużyć się serią przekrojów przez obserwowany preparat, jak również, o czym będzie mowa w dalszej części artykułu, stworzyć projekcję trójwymiarowej rekonstrukcji całego preparatu w zadanej perspektywie. Często użyteczna jest możliwość wykonania pionowego przekroju przez obiekt, wzdłuż płaszczyzny prostopadłej do płaszczyzny zazwyczaj obserwowanej. Przygotowanie preparatu dla potrzeb CLSM jest bardzo podobne do przygotowywania preparatów do tradycyjnej mikroskopii immunofluorescencyjnej. Występuja jednak pewne drobne różnice. Najważniejszą jest rezygnacja z wszelkich praktyk majacych na celu spłaszczenie preparatu. Są one nie tylko niepotrzebne, ale wręcz szkodliwe, gdyż uniemożliwiają zachowanie nie zmienionej, trójwymiarowej struktury obserwowanego obiektu. Korzystając z mikroskopu konfokalnego należy chronić preparat przed przypadkowym zgnieceniem przez szkiełko przykrywkowe, na przykład używając odpowiedniej wielkości koralików szklanych lub ziaren sephadex'u wprowadzonych pomiędzy szkiełka przed zamknięciem preparatu. Następna różnica jest wynikiem bardzo dobrego tłumienia światła pochodzącego spoza płaszczyzny obserwacji mikroskopu konfokalnego. Pozwala ono na stosowanie znacznie większych stężeń barwnika niż w tradycyjnym mikroskopie, gdzie świecenie spoza płaszczyzny ostrości utrudnia rozróżnianie szczegółów. Wyższe stężenie barwnika powoduje intensywniejsze świecenie preparatu, a to z kolei umożliwia zmniejszenie czułości detektora, co powoduje zmniejszenie szumów w obrazie, który staje się jeszcze bardziej czysty i bardziej kontrastowy niż by to wynikało z samego wykorzystania efektu konfokalnego. Aby osiągnąć wyższe stężenie barwnika, należy podczas przygotowywania preparatu zastosować wyższe stężenie sprzężonego z nim przeciwciała. Na ogół stężenie to jest około czterdzieści do pięćdziesięciu razy większe niż w metodzie tradycyjnej. Niestety stosowanie tak dużych ilości przeciwciał w znacznym stopniu podnosi koszty metody. Preparaty barwione niskim stężeniem sprzęganego z barwnikiem przeciwciała również dają poprawne obrazy i doskonale nadają się do prac wstępnych, których wyniki nie będą publikowane.

Przy zastosowaniu CLSM bardzo istotny jest dobór używanego barwnika fluorescencyjnego (Tsien i Waggoner 1990). Wynika to z ograniczonej ilości pasm chromatycznych, jakie daje laser (Gratton i vande Ven 1990). W normalnym mikroskopie fluorescencyjnym źródłem światła jest lampa rtęciowa, produkująca światło o wszystkich długościach fali, jakie wykorzystuje się w mikroskopii fluorescencyjnej. Różne długości mają w jej widmie różne natężenia, ale w zasadzie wszystkie możemy wykorzystać do wzbudzania barwnika. W przypadku lasera jest inaczej. Laser emituje światło tylko w określonych pasmach częstotliwościowych, czyli o wąskich przedziałach długości fali. Światło o pośrednich długościach fali nie jest emitowane. W mikroskopie Phoibos 1000 (podobnie jak w większości innych dostępnych na rynku) zastosowany jest laser gazowy (argonowy) o niskiej mocy w trzech pasmach: 457 nm, 488 nm i 514 nm. Odpowiadają one mniej więcej światłu: fioletowemu, niebieskiemu i zielonemu. Używane barwniki muszą być tak dobrane, by długości fali wzbudzającego je światła odpowiadały długościom dostępnym w pasmach lasera. Laser jest tak wybrany, aby pokrywać długość fali wzbudzającej najpopularniejszy barwnik fluorescencyjny, izotiocyjanian fluoresceiny, którego maksimum absorpcji znajduje się w pobliżu 488 nm (T s i e n i W a g goner 1990). Powoduje to jednak bardzo słabe wzbudzanie drugiego bardzo popularnego barwnika, izotiocyjanianu tetrametylrodaminy (TRITC), którego maksimum absorpcji, zlokalizowane koło 550 nm (Tsien, Waggoner 1990), jest tak odległe od długości fali wzbudzającej, że barwnik świeci z bardzo zredukowaną intensywnością. Nakłada się na to fakt, że linia 514 nm jest najsłabszą linią lasera. W sumie świecenie rodaminy jest słabe i jeśli istnieje taka możliwość, należy użyć innego barwnika. Najlepiej do tego nadaje się R-fikoerytryna, wzbudzana przy 488 nm (Tsien i Waggoner 1990). Jej użycie jest bardzo dogodne, jeśli chcemy obserwować preparat podwójnie barwiony przy użyciu dwóch detektorów. Sprzyja temu wspólna z fluoresceina długość fali światła

130

wzbudzającego. Barwnik ten ma jednak znaczną wadę. Na rynku jest znacznie mniej sprzęganych z nim przeciwciał niż sprzęganych z TRITC. Ma to szczególne znaczenie przy wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych, gdzie przeciwciała wtórne, przeciw mysim immunoglobulinom, pochodzące od jednego producenta, mogą dawać bardzo słabą lub nie dawać wcale reakcji z pierwotnym, mysim, przeciwciałem pochodzącym od drugiego producenta. W takich sytuacjach użycie TRITC jest możliwe, choć uzyskane efekty mogą odbiegać od oczekiwań.

Oprócz immunocytochemicznego, możliwe jest też bezpośrednie barwienie struktur komórkowych barwnikami fluorescencyjnymi. W ostatnich latach stworzono cały zestaw sond chemicznych, specyficznych dla różnych organelli komórkowych. Barwniki te, przy stosunkowo niskiej szkodliwości omiatającego światła laserowego, pozwalają przyżyciowo barwić poszczególne struktury wewnątrz komórki. Do barwienia mitochondriów można wykorzystać rodaminę 123 wzbudzoną przy 505 nm pasmem zielonym (Haugland 1989). Mniej specyficznie, ale stosunkowo precyzyjnie, można barwić siateczkę śródplazmatyczną używając karbocyjaniny DiOD₆, wzbudzanej przy 484 nm pasmem niebieskim (Haugland 1989). Cała rodzina innych karbocyjanin (głównie DiOC₁₆ i DiOC₁₈) bardzo wydajnie barwi wszystkie struktury błoniaste w komórce. Spośród nich DiOC₁₈, wzbudzająca się przy 484 nm, dobrze nadaje się do użycia w CLSM (H a u g l a n d 1989). Specyficzną sondą dla aparatu Golgiego jest ceramid kwasu NBD dodekanowego, wzbudzany pasmem niebieskim przy 481 nm (Cooper i in. 1990). Trudniejsze jest znakowanie jądra komórkowego. Większość popularnych barwników znakujących DNA, takich jak oranż akrydyny, DAPI czy barwniki z grupy Hoechst, wymagają wzbudzania w zakresie ultrafioletu i nie nadają się do wykorzystania w mikroskopii konfokalnej. Pozostaje tylko bromek etydyny, który barwi zarówno DNA, jak i RNA, co może zaciemniać obraz. Jego zaletą jest to, że wzbudzając się podobną długością fali co FITC (482 nm) może być również wykorzystany do wizualizacji jadra w obserwacji preparatów przygotowanych immunocytochemicznie (H a u g land 1989). Coraz częściej pojawiają się prace wykorzystujące barwienie jądra metodami in situ hybrydyzacji z fluorescencyjnymi sondami (v a n Dekken i in. 1990.

Opisane dotąd barwniki służą do tworzenia statycznych obrazów struktury badanych obiektów. W ostatnich latach otrzymano również całą grupę barwników pozwalających określać fizjologiczny stan komórki. Najpowszechniej używane barwniki z tej grupy to sondy molekularne pozwalające określać wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapniowych. Najdoskonalsza z tych substancji, Fura 2, nie nadaje się do wykorzystania w CLSM, ponieważ wymaga wzbudzania światłem ultrafioletowym. Do wykorzystania w tej metodzie nadaje się jednak inny barwnik, Fluo-3. Maksimum jego absorpcji przypada na 505 nm, zaś wydajność kwantowa waha się od 0,0051 przy niskim stężeniu jonów Ca²⁺ do 0,183 przy wysokim stężeniu Ca²⁺, pozwalając precyzyjnie określać względne różnice stężeń wapnia (H a u g l a n d 1989). Największą wadą Fluo-3 jest to, że

w odróżnieniu do Fury 2, zmianie indukowanej przez jony wapnia ulega tylko jeden parametr z charakterystyki barwnika. Niemożliwe jest więc określenie dokładnego stężenia Ca²⁺, jeśli nie znamy stężenia samej sondy, a wyznaczenie stężenia barwnika wewnątrz komórki jest praktycznie niewykonalne. Teoretycznie istnieje możliwość, że jego rozkład w cytoplazmie jest nierównomierny, a to w sposób zasadniczy rzutowałoby na otrzymane wyniki. Mimo tych wad wykorzystuje się barwnik Fluo-3 i mikroskop konfokalny do określania zmian stężenia Ca⁺²⁺ na niewielkich obszarach, a to z przyczyn, które szczegółowo omówimy przy okazji opisu parametrów czasowych pracy CLSM (Niggli i Lederer 1990). Podobnie jak z sondą określającą wewnątrzkomórkowe pH, z użyciem fluoresceiny BCECF. Barwnik ten, podobnie jak Fura 2, należy do grupy pozwalającej na bezwzględne określenie stężenia badanej substancji na podstawie wyznaczania stosunku intensywności świecenia wzbudzanego dwoma długościami fali. Laser argonowy niskiej mocy, stanowiący źródło światła w CLSM, pozwala na wzbudzenie fluoresceiny BCECF tylko w jednej z tych długości, 490 nm. Istnieje więc tu ten sam problem co w przypadku oznaczania stężenia wapnia za pomocą Fluo-3 (Haugland 1989).

Wada oświetlenia laserowego, jaką jest dyskretny charakter jego widma, w jednym przypadku stanowi pewne ułatwienie. W tradycyjnej mikroskopii fluorescencyjnej preparaty podwójnie barwione wymagają osobnej obserwacji dla każdego barwnika. Z uwagi na ciągłość widma emisji lampy rtęciowej, za każdym razem musimy wycinać (za pomocą filtrów) wąski jego wycinek w celu wzbudzenia barwnika. W przeciwnym razie światło emitowane przez ten barwnik zostałoby całkowicie zagłuszone przez odbite od preparatu światło wzbudzające o tej samej długości fali. W przypadku lasera, jeśli tylko długości światła emitowanego przez barwniki nie pokrywają się z żadnym z jego pasm aktywnych, możemy oświetlić preparat wiązką niefiltrowaną. Emituje on wtedy światło pochodzące z obu barwników, które możemy skierować na dwa detektory i rozdzielić za pomocą odpowiednich filtrów barierowych. Pozwala to na jednoczesną obserwację obu barwników, co jest szczególnie istotne przy barwieniach przyżyciowych, gdzie obraz preparatu zmienia się w czasie (M o s s b e r g i E r i c s s o n 1990).

Oprócz wykorzystania technik fluorescencyjnych, CLSM pozwala na pracę z użyciem światła odbitego. Ten typ oświetlenia pozwala na oglądanie preparatów znakowanych złotem koloidalnym (W h i t e i in. 1989). Jest to użyteczna technika, jeśli chcemy połączyć mikroskopię świetlną z elektronową. Możemy wtedy obejrzeć przygotowany preparat w niskich powiększeniach mikroskopu optycznego i następnie, po zatopieniu w żywicy, badać jego ultrastrukturę w mikroskopie elektronowym. Powiązanie tych dwóch technik jest szczególnie obiecujące w badaniach morfologii cytoszkieletu.

Wspomniano już, że CLSM jest szczególnie użytyczny do przyżyciowego badania układów dynamicznych. Jest to wynikiem małej, w porównaniu z pełnym oświetleniem przez tradycyjną lampą rtęciową, szkodliwości omiatają-

132

cej wiązki laserowej. Istnieje jednak poważne ograniczenie tej metody, jakie stanowi jej rozdzielczość czasowa. Często nie zdajemy sobie sprawy, że każda obserwacja w konwencjonalnym mikroskopie optycznym przebiega w czasie rzeczywistym, czyli cały czas możemy obserwować całą powierzchnię obiektu. W przypadku CLSM jest inaczej. Kolejne punkty obrazu są obserwowane po kolei. Mimo że prędkość omiatania wiązki jest stosunkowo duża, to jednak zebranie pojedynczego obrazu wymaga pewnego czasu. W zależności od wielkości obserwowanego pola czas ten jest zmienny i wynosi od około 1 sekundy dla pola 64 na 64 piksele do około 20 sekund dla pola 1024 na 1024 piksele. Obserwowany proces musi być na tyle powolny, by w ciągu czasu potrzebnego do zebrania jednego obrazu nie zaszły istotne zmiany. W przeciwnym razie w jednym obrazie beda reprezentowane w różnych miejscach różne etapy zjawiska. Uniemożliwia to rejestację szybko poruszających się komórek, intensywnych strumieni cytoplazmatycznych i innych szybkich procesów. W tych przypadkach trzeba użyć tradycyjnych mikroskopów optycznych lub, jeśli musimy wykorzystać efekt konfokalny - mikroskopu tandemowego, z rejestracją obrazu techniką video. Uzyskiwana wtedy rozdzielczość czasowa jest 50 razy większa i wynosi około 20 ms. Od tej reguły jest jeden wyjątek. Konstrukcja CLSM umożliwia osiągnięcie rozdzielczości czasowej lepszej niż przy użyciu magnetowidu, jeśli zrezygnujemy z odtwarzania całego obrazu na rzecz obserwacji jednej linii biegnącej przez preparat. Wynika to z tego, że wiązka lasera w mikroskopie konfokalnym jest odchylana przez dwa lustra, tak zwane łustro szybkie, obracane galwanometrycznie, i lustro wolne, sterowane mechanicznie. Jeżeli zrezygnujemy z lustra wolnego i będziemy omiatać jedną linię za pomocą lustra szybkiego, możemy uzyskać czas rejestracji linii rzędu 8 ms, czyli znacznie lepszy niż w przypadku techniki video. Dalsze przyspieszenie rejestracji jest niemożliwe ze względu na konieczność zachowania pewnego, minimalnego czasu całkowania prądu z fotodetektora, by uzyskać odpowiedni odstęp sygnału od szumów. Metoda ta została z powodzeniem zastosowana do badania szybkich zmian poziomu wapnia w komórkach mięśniowych (Niggli i Lederer 1990).

W tradycyjnej mikroskopii optycznej uzyskanie obrazu kończy pracę. W przypadku CLSM jest inaczej. Dalsza obróbka cyfrowa surowego obrazu stanowi integralną część procesu obserwacji. W odróżnieniu od obrazu uzyskanego inną metodą, na przykład fotograficznie, którego struktura jest ciągła, już pierwotny wynik pracy mikroskopu konfokalnego ma charakter cyfrowy. Obraz taki jest nieciągły, to znaczy składa się z określonej liczby punktów, zwanych pikselami, dla których określona jest jasność. Ich duża ilość zapewnia złudzenie płynności zmian szarości w obrazie (W e b b i D o r e y 1990). Obraz taki, zwany inaczej rastrowym, bardzo dobrze poddaje się rozmaitym manipulacjom. Możemy swobodnie dobierać formę prezentacji, używając skali szarości, by obraz przypominał zdjęcie czałno-białe, decydować się na jego zabarwienie, tak by wyglądał jak naturalne świecenie danego barwnika (lub arbitralnie wybranego jakiegokolwiek innego np. obraz uzyskany z preparatu barwionego fluoresceiną możemy przedstawić jako czerwone świecenie rodaminy), czy wreszcie zastosować kodowanie tak zwanym pseudokolorem. Ta ostatnia metoda polega na arbitralnym przypisaniu jakiegoś koloru do każdej wartości jasności obrazu czarno białego. Powstaje kolorowa mapa jasności, bardzo praktyczna gdy jasność ta odpowiada na przykład stężeniu wapnia w danym miejscu komórki. Taka obróbka może dotyczyć także większej liczby obrazów. Na przykład, znając siłę, z jaką fluoresceina świeci w pasmie rodaminy i odwrotnie, możemy dokonać ostatecznej separacji obrazów preparatu podwójnie barwionego. Możemy też oczywiście dwa takie obrazy zakodować właściwymi im kolorami i nałożyć na siebie. Jeśli obraz jest słaby, możemy dokonać cyfrowego wzmocnienia kontrastu, tak by był dobrze widoczny. Jeśli jest zaś zakłócony szumami na skutek konieczności używania bardzo czułego detektora, możemy dokonać jego liniowej filtracji zmniejszając ten niekorzystny efekt.

Oprócz indywidualnej obróbki każdego obrazu, CLSM, pozwala na rekonstrukcję przestrzenną obserwowanego obiektu. W tym celu wykorzystuje się serie skrawków optycznych. Serią skrawków jest grupa przekrojów optycznych dokonanych w równoległych do siebie płaszczyznach oddalonych od siebie o stałą odległość, równą lub większą od pionowej zdolności rozdzielczej mikroskopu. Każdy skrawek składa się z określonej liczby pikseli. Każdemu z tych pikseli nadajemy grubość równą odległości pomiędzy płaszczyznami przekrojów, tworząc w ten sposób woksel (od ang. volume pixel) (Gratton i vandeVen 1990). W ten sposób w pamięci komputera powstaje trójwymiarowa reprezentacja obserwowanego obiektu. Jest ona dla nas niedostępna bezpośrednio, gdyż naszą drogą komunikacji z komputerem jest dwuwymiarowy ekran monitora. Aby obejrzeć tak powstałą rekonstrukcję, musimy stworzyć jej dwuwymiarową projekcję. Istnieje wiele metod tworzenia tych projekcji. Dobór metody zależy od tego, jakie właściwości obiektu chcemy obrazować (B r a k e nhoff i in. 1988, 1989: Carlsson i in. 1989: Scheynius i Lundhal 1990: van der Voort 1989). Projekcje, z praktycznego punktu widzenia, dzielimy na szybkie i perspektywiczne. Projekcje szybkie są tworzone równolegle do rejestracji serii obrazów. Obiekt w takiej projekcji widoczny jest zawsze tak jak w konwencjonalnym mikroskopie. CLSM Phoibs 1000 pozwala na dwa typy takich rekonstrukcji: projekcje maksymalnej intensywności (rys. 5) i projekcje typu rentgenowskiego (rys. 6). W pierwszym przypadku jasność piksela ostatecznego obrazu jest równa jasności najjaśniejszego woksela z leżącej pod nim kolumny, w drugim jasność ta jest równa średniej z kolumny. Warto zdawać sobie sprawę, że w przypadku mikroskopii tradycyjnej widziany obraz jest tego samego typu rekonstrukcją i ostateczna jasność obrazu jest sumą jasności z wszystkich warstw obiektu. Większe możliwości daje zastosowanie projekcji perspektywicznych, wymagają one jednak znacznie więcej obliczeń i otrzymanie ich zajmuje więcej czasu. W projekcji perspektywicznej użytkownik dowolnie wybiera punkt w przestrzeni z którego obserwuje rekonstruowany obiekt. Po

134



Rys. 5. Stereopara przedstawiająca projekcję typu maksymalnej intensywności. Obraz przedstawia komórkę orzęska *Paraurostyla weissei* barwioną fluoresceiną sprzęganą z przeciwciałem przeciw α-tubulinie. Aby uzyskać wrażenie trójwymiarowości przy oglądaniu stereopar, należy rozdzielić zdjęcia pionowo ustawioną kartką papieru i starać się patrzeć na jedno z nich lewym, a na drugie prawym okiem

Rys. 6. Stereopara przedstawiająca projekcję typu rentgenowskiego tej samej komórki. (Preparat widoczny na rys. 5–6 otrzymany dzięki uprzejmości p. mgr Małgorzaty Frontczak z Zakładu Biologii Komórki IBD im. M. Nenckiego PAN) wybraniu kierunku patrzenia wybieramy zasadę rekonstrukcji. Szczególniebogato oprogramowany Phoibos 1000 pozwala na użycie jednej z czterech takich metod. Pierwszą jest opisana już metoda maksymalnej intensywności (rys. 7). Różnica polega na tym, że najjaśniejszy woksel nie jest wybierany z kolumny, ale jest ustalany wzdłuż promieni rozchodzących się z punktu patrzenia. Drugą jest metoda rekonstrukcji powierzchniowej (rys. 8). W metodzie tej ustalamy graniczną wartość jasności pomiędzy wnętrzem obiektu a jego otoczeniem. Granica ta określa powierzchnię obiektu, która jest następnie cieniowana względem pozornego źródła światła i obserwowana z wybranego punktu. Metoda ta daje szczególnie efektowne obrazy, zbliżone do obrazów tworzonych przez skaningowy mikroskop elektronowy. Trzecia metoda, którą można nazwać metodą naturalną (rys. 9), polega na sumowaniu jasności wzdłuż promieni rozchodzących się z punktu



Rys. 7–10. Projekcje trójwymiarowej rekonstrukcji komórki granulocytu barwionego okradecylrodaminą. Zdjęcia przedstawiają projekcje: 7 — maksymalnej intensywności, 8 — powierzchniową, 9 — naturalną i 10 — kodowaną głębokość obrazu (komórki otrzymane dzięki uprzejmości prof. dr Jana Doroszewskiego z Centrum Med. Kształcenia Podyplomowego)



Rys. 11 A–H. Obrót rekonstrukcji przestrzennej typu powierzchniowego wokół osi pionowej. Kolejne projekcje sporządzano co 20°. Obraz przedstawia ten sam granulocyt co na poprzednich ilustracjach

obserwacji. Powstający obraz jest taki, jaki widzielibyśmy obserwując powiększony obiekt gołym okiem. Ostatnia metoda rekonstrukcji, zwana kodowaniem głębokości (rys. 10), służy do obróbki obiektów nieprzezroczystych. Jasność danego punktu obrazu zależy od odległości pomiędzy obserwatorem a punktem na powierzchni obiektu. Możemy też tworzyć serie projekcji pozwalających nam obserwować obiekt ze wszystkich stron (rys. 11).

Podsumowując, należy stwierdzić, że CLSM nie jest mikroskopem doskonałym, nie jest też ulepszoną wersją mikroskopu fluorescencyjnego. Jest przyrządem nowym, którego pole możliwości pokrywa się częściowo z możliwościami sprzętu tradycyjnego, ale w wielu zastosowaniach umożliwia całkiem nowe podejście do badanego materiału. Rozszerzenie możliwości badania komórek *in vivo* budzi nadzieję tam, gdzie ważna jest nie tylko badana struktura, ale i jej zmiany w czasie, jak przy analizie ruchów komórek i zjawisk im pokrewnych, takich jak cytokineza, endo- i egzocytoza, ruchy wewnątrzkomórkowe i wiele innych. Najlepszym dowodem na upowszechnianie się mikroskopii konfokalnej jest wykładniczy wzrost liczby publikacji w których metoda ta jest wykorzystywana ukazujących się w biomedycznych czasopismach naukowych. Wszystkie te fakty, oraz pojawienie się pierwszego CLSM w Polsce, skłoniło mnie do napisania tego artykułu, którego celem jest przybliżenie mikroskopii konfokalnej szerokiemu gronu biologów.

CONFOCAL MICROSCOPY — TOWARD THE IDEAL MICROSCOPE

Summary

Short and simple outline of a new method in optical microscopy — the confocal microscopy is presented. This new method gives quite new possibilities in visualisation of the biological material. Confocal Scanning Laser Microscope (CSLM) is one of the most recent constructions in optical microscopy. It offers improved rejection of out-of-focus noise and greater resolution than the conventional fluorescence imaging. In the CSLM condenser and objective lenses are identical and mounted confocally. The image plane is projected onto the pinhole aperture. The only light allowed through this diaphragm is light emitted from the objective focal plane. This cuts off any out-of-focus image blurring.

The short history of confocal microscopy, from Marvin Minsky patent to tandem scanning microscope and CSLM is presented. The second part of the article describes some particular features of confocal microscopy methods. The limitations of laser as the light source are discussed. Some fluorescence dyes are not fit for CSLM due to their excitation wavelengths. The most useful dyes for Ca^{2+} and H^+ detection and selective membrane dyes are described. Multiple dye staining is described and the troubles with TRITC as the most popular second dye are stressed. The computer processing of signal from fotodetector is the last topic discussed. The background of two- and three-dimensional data presentation, simple methods of image contrast enhancement of projecting three-dimensional vectors onto such images are presented.

LITERATURA

- 1. A mos W. B. Results obtained with a sensitive confocal scanning system designed for epifluorescence. Cell Motil. Cytoskeleton 10: 54–61, 1988.
- 2. Boyde A., Jones S. J., Taylor M. L., Wolfe L. A., Watson T. F. Fluorescence in the tandem scanning microscope. J. Microsc. 157: 39-49, 1990.
- 3. Brakenhoff G. J., van der Voort H. T., Baarslag M. W., Mans B., Oud J. L., Zwart R., van Driel R. — Visualization and analysis techniques for three dimensional information acquired by confocal microscopy. Scanning. Microsc. 2: 1831–1838, 1988.
- Brakenhoff G. J., van der Voort H. T. van Spronsen E. A., Nanninga N. — Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy. J. Microsc. 153: 151-159, 1989.
- 5. Carlsson K., Wallen P., Brodin L. *Three-dimensional imaging of neurons by confocal fluorescence microscopy*. J. Microsc. 155: 15–26, 1989.
- Cooper M. S., Cornell Bell A. H., Chernjavsky A., Dani J. W., Smith S. J. — Tubulovesicular processes emerge from trans-Golgi cisternae, extend along microtubules, and interlink adjacent trans-golgi elements into a reticulum. Cell 61: 135–145, 1990.
- Gratton, E., vandeVen, M.J. Laser Sources for Confocal Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 53-67.
- 8. Haugland R.P. Molecular Probes. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc., Eugene, 1989.
- 9. Hook G.R., Odeyale C.O. Confocal scanning fluorescence microscopy: a new method for phagocytosis research. J. Leukoc. Biol. 45: 277–282, 1989.
- 10. Inoue S. Progress in Video Microscopy. Cell Motil. Cytoskeleton 10: 13-17, 1988.
- In oue, S. Fundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 1–14.
- Keller, H.E. Objective Lenses for Confocal Microscopy. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 77-86.
- Kino, G.S. Intermediate Optics in Nipkow Disk Microscopes. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 105-111.
- Mossberg K., Ericsson M. Detection of doubly stained fluorescent specimens using confocal microscopy. J. Microsc. 158: 215-224, 1990.
- 15. Niggli E., Lederer W.J. Real-time confocal microscopy and calcium measurements in heart muscle cells: towards the development of a fluorescence microscope with high temporal and spatial resolution. Cell Calcium 11: 121–130, 1990.
- Ploem, J.S. Fluorescence Microscopy. W: Light Microscopy in Biology. A Practical Approach, Pod red. Lacey, A.J. IRL Press, Oxford, 1989, s. 163–186.
- 17. Scheynius A., Lundahl P. Three-dimensional visualization of human Langerhans' cells using confocal scanning laser microscopy. Arch. Dermatol. Res. 281: 521-525, 1990.
- Sheppard C.J., Wilson T. The theory of the direct-view confocal microscope. J. Microsc. 124: 107-117, 1981.
- Tsien. R.Y., Waggoner, A. Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy, Pod red. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and Lodnon, 1990, s. 169–178.
- 20. van Dekken H., van Rotterdam A., Jonker R., van der Voort H.T., Brakenhoff G.J., Bauman J.G. — Confocal microscopy as a tool for the study of the intranuclear topography of chromosomes. J. Microsc. 158: 207-214, 1990.

- 21. van der Voort H.T., Brakenhoff G.J., Baarslag M.W. Three-dimensional visualization methods for confocal microscopy. J. Microsc. 153: 123–132, 1989.
- 22. Webb, R.H., Dorey, C.K. *The Pixelated Image. W: Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Podred. Pawley, J.B. Plenum Press, New York and London, 1990, s. 41–51.
- White J.G., Amos W.B., Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. 105: 41–48, 1987.
- 24. White N.S., Lackie P.M., Shotton D.M. Imaging of immunogold labelled antigens on capping thymocytes by confocal reflection contrast scanning optical microscopy. Cell Biol. Int. Rep. 13: 941–948, 1989.
- 25. Wilson T. Trends in confocal microscopy. Trends. Neurosci. 12: 486-493, 1989.