

Pohledy do trojrozměrného mikrosvětla: konfokální a dvoufotonová mikroskopie

Lucie Kubínová

První optický mikroskop byl sestaven již kolem r. 1595 v dílně Holanďanů Hanse a Zachariase Janssena, avšak v následujících staletích byly mikroskopy stále více zdokonalovány. V posledních několika desetiletích zaznamenává optická mikroskopie bouřlivý vývoj, kdy se díky novým typům optických mikroskopů založených na důmyslných principech významným způsobem rozšiřují její možnosti. Mezi stále častěji vyhledávané metody optické mikroskopie patří konfokální a dvoufotonová mikroskopie, přinášející nové možnosti pozorování a analýzy zejména biologických vzorků. V České republice byl první laserový konfokální mikroskop instalován v r. 1993 v oddělení biomatematicky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, kde byl o 10 let později uveden do provozu také první dvoufotonový mikroskop.

Princip konfokální mikroskopie

Princip konfokálního mikroskopu si nechal patentovat americký vědec M. Minsky v r. 1957, avšak jeho vynález našel širší uplatnění až o 30 let později. Do historie konfokální mikroskopie se zapsala i česká věda — M. Petráň a M. Hadravský z Lékařské fakulty UK v Plzni zkonstruovali v r. 1965 nový typ konfokálního mikroskopu, tzv. tandemový mikroskop neboli mikroskop s dvojnásobným řádkováním, který patentovali v r. 1968. Jak Minsky, tak Petráň s Hadravským sestavili své mikroskopy pro účely studia neuronů v mozku.

Při pozorování v konfokálním mikroskopu (obr. 1) je studovaný vzorek osvětlen bodovým zdrojem světla, nejčastěji laserovým paprskem zaostřeným na tzv. první konfokální clonku, kterou objektiv mikroskopu zobrazí do bodu uvnitř vzorku. Odtud pak světlo odražené vzorkem či emitované fluorescencí prochází zpětně

objektivem a vytvoří další obraz této bodové clonky v zadní ohniskové rovině, kde je umístěna druhá konfokální clonka. Ta zabrání průchodu záření z nezaostřených míst vzorku a tím i jeho detekci, neboť detektor (fotonásobič) je umístěn až za clonkou. Konfokální clonka tak odstraní příčinu rozmazání obrazu při pozorování tlustších vzorků klasickým optickým mikroskopem (obr. 3).

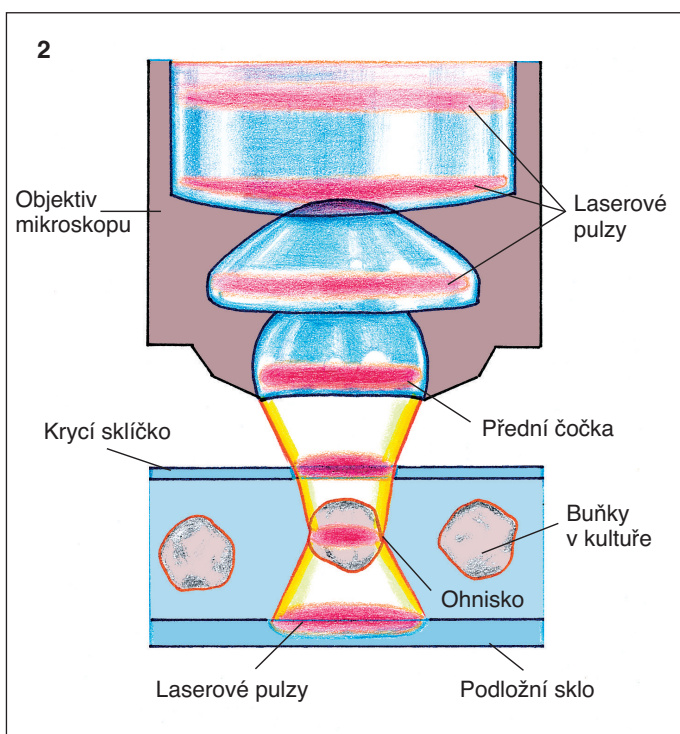
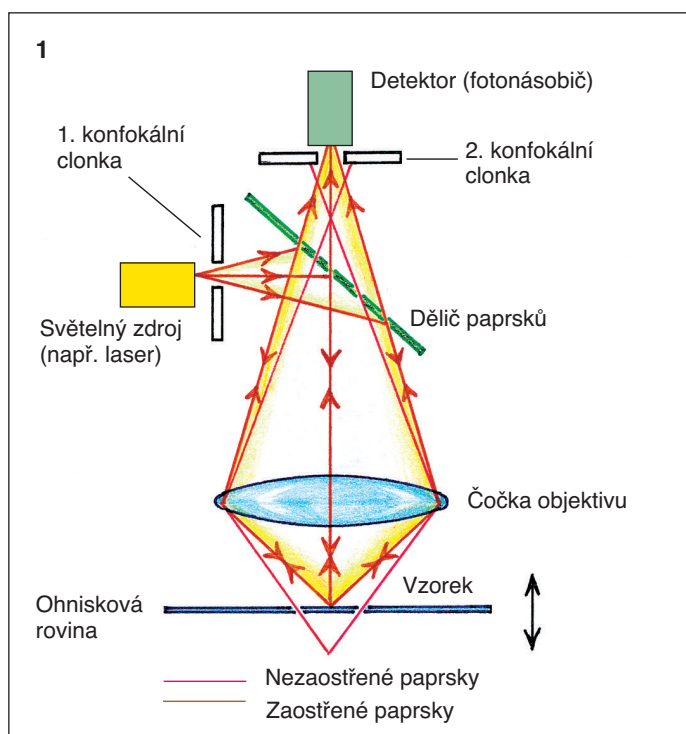
V současné době je nejčastěji používaným typem konfokálního mikroskopu laserový rastrovací konfokální mikroskop, ve kterém se obraz roviny zaostření získá rastrováním zorného pole rozmítáním laserového paprsku. Tento typ mikroskopu byl uveden na trh v 80. letech 20. stol. Další podrobnosti o konfokální mikroskopii lze získat např. z knihy J. B. Pawleyho Handbook of Biological Confocal Microscopy (Plenum Press 1995), v češtině z článku J. Pláška (Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 1996, 41: 1-24).

Mezi hlavní přednosti konfokální mikroskopie ve srovnání s klasickou optickou mikroskopií patří lepší rozlišení ve směru kolmém k rovině pozorování (tj. vyšší axiální rozlišovací schopnost, která je např. rovna 350 nm při vlnové délce budícího světla 488 nm) a potlačení rušivého záření z nezaostřených částí studovaného vzorku. Tak je možné vést tenké optické řezy i tlustším vzorkem a při jeho postupném proostřování zaznamenávat i celé série optických řezů (obr. 4). Tyto sériové řezy jsou navíc přesně slícované, a tak jejich digitalizované obrazy představují vhodná vstupní data pro trojrozměrnou rekonstrukci a analýzu mikroskopických struktur.

Princip dvoufotonové mikroskopie

Podobný způsob trojrozměrného zobrazování mikroskopických struktur umožňuje další, ještě novější typ optického mikroskopu, tzv. dvoufotonový mikroskop, který poprvé představili v r. 1990 američtí vědci v čele s W. W. Webbem z Cornellské univerzity. Tento mikroskop zobrazuje tenké optické řezy tlustším vzorkem, podobně jako „klasický“ konfokální mikroskop, avšak jeho princip je odlišný. Místo jednofotonové excitace (buzení) se zde využívá excitace dvěma fotony, které jsou absorbovány prakticky současně, tedy v jediném kvantovém okamžiku. Toto je možné zabezpečit pouze pomocí speciálního laseru, který vysílá fotony s šířkou pulzu řádově pouhých 100 femtosekund (10^{-13} s). K dvoufotonové excitaci dochází pouze v ohnisku objektivu (obr. 2), a proto k získání obrazů optických řezů vzorkem nepotřebujeme odštiňovat obraz z nezaostřených míst pomocí konfokální clonky, jako je tomu u jednofotonového konfokálního mikroskopu. Vzorek je tak ozařován pouze bodově a zhášení fluorescenčních barviv v nezaostřených místech vzorku je výrazně omezeno.

Obr. 1 Princip konfokálního mikroskopu. Podle L. Ladica kreslil S. Holeček ♦ Obr. 2 Princip dvoufotonové mikroskopie. Podle M. W. Davidsona kreslil S. Holeček



Mezi další výhody dvoufotonové mikroskopie ve srovnání s klasickou konfokální mikroskopií patří větší hloubka proostření (až do 400 μm) i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy vykazují silnou fluorescenci a zvýšený podíl signálu k šumu, tedy i kontrastnější obrazy, zejména ve větších hloubkách vzorku (obr. 5). Dále je to zpravidla snížená fototoxicita, umožňující dlouhodobé pozorování živých buněk a tkání i při použití fluorescenčních barviv s UV excitací. Dvoufotonová mikroskopie poskytuje rovněž lepší možnosti pro odlišení jednotlivých molekul ve vzorku pomocí nejmodernějších metod, např. metodou fluorescenc z rezonančního přenosu energie (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer), která využívá neradiačního přenosu energie fotonů z excitovaného fluorochromu na druhý fluorochrom a umožňuje měřit interakce mezi dvěma molekulami bílkovin nebo dokonce i strukturální změny uvnitř jediné molekuly.

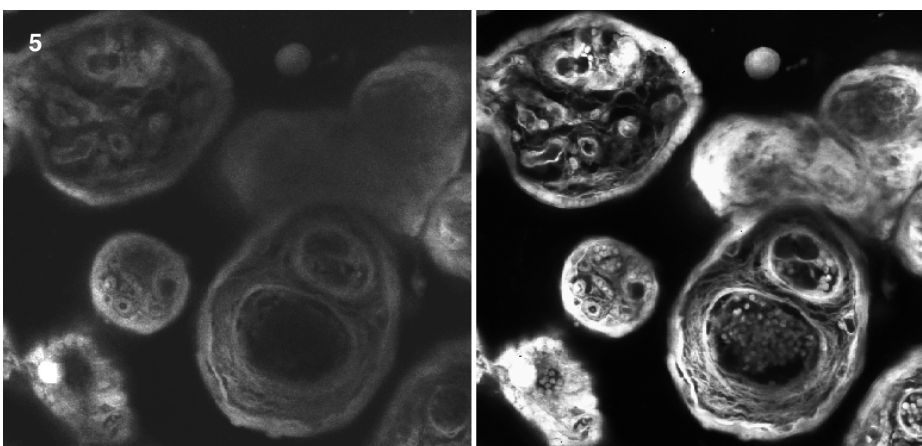
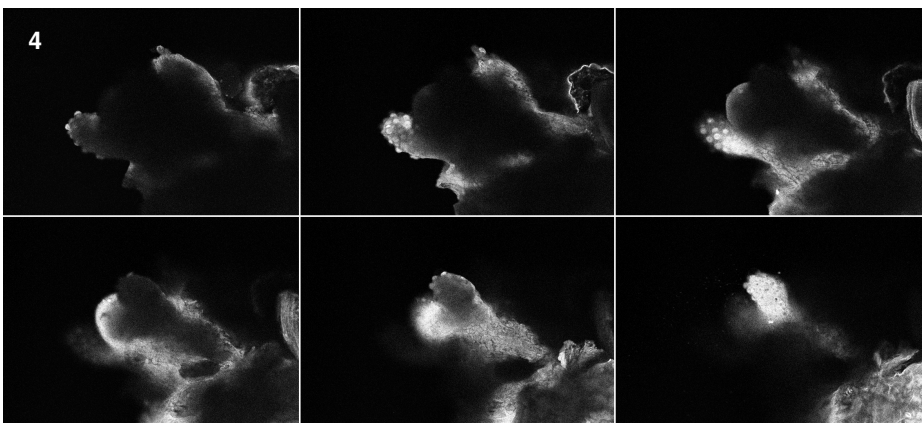
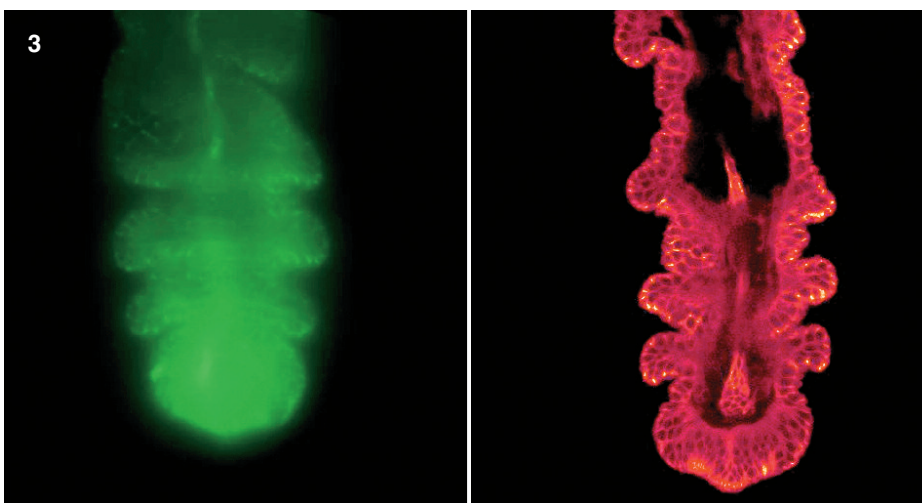
Využití konfokální a dvoufotonové mikroskopie

Konfokální a dvoufotonová mikroskopie mají široké využití v mnoha biologických oborech, např. v buněčné a molekulární biologii a ve fyziologii. Umožňují zobrazit tenké optické řezy buňkami či tkáněmi a určit vzájemnou polohu jejich různých komponent s využitím vícenásobného fluorescenčního barvení (obr. 6). Při fyziologických studiích bývají často využívány časové série, zaznamenávající časové změny např. v koncentraci různých iontů v daných oblastech studovaného vzorku. K zjištění dynamických změn v různých hloubkách živých buněk či tkání lze snímat i časoprostorové série. Digitální obrazy sérií optických řezů představují data vhodná pro kvantitativní měření i pro počítačové trojrozměrné rekonstrukce relativně velkých oblastí vzorku, aniž by bylo nutné řešit problém lícování následných fyzických sériových řezů.

Trojrozměrné rekonstrukce mikroskopických struktur

Jednoduchý způsob trojrozměrné rekonstrukce mikroskopických struktur je založen na projekcích celé série řezů objektem. Nejčastěji se používá tzv. maximální projekce, kterou jsou zobrazeny obrazové elementy s maximální hodnotou šedi ze všech řezů v sérii (obr. 7). Trojrozměrný vjem je možné zesílit postupnou rotací projekce objektu nebo vytvořením tzv. stereoobrazů, které využívají prostorového vidění člověka založeného na pozorování trojrozměrného objektu ze dvou směrů (tj. dvěma očima) svírajících malý úhel. Tato situace je simulována vytvořením dvou projekcí objektu, pootočených vůči sobě o malý úhel s tím, že člověk jednu z těchto projekcí vidí pouze levým a druhou pouze pravým okem. Tak můžeme dostat např. anaglyfový obraz (obr. 7), kdy je jedna z projekcí obarvena zeleně, druhá červeně

Obr. 3 Obraz noby mušky octomilky (*Drosophila melanogaster*) nasnímaný klasickým fluorescenčním mikroskopem (vlevo) a konfokálním mikroskopem (vpravo), který poskytuje ostřejší obraz optického řezu vzorkem. Snímky laskavě poskytla firma Leica Microsystems



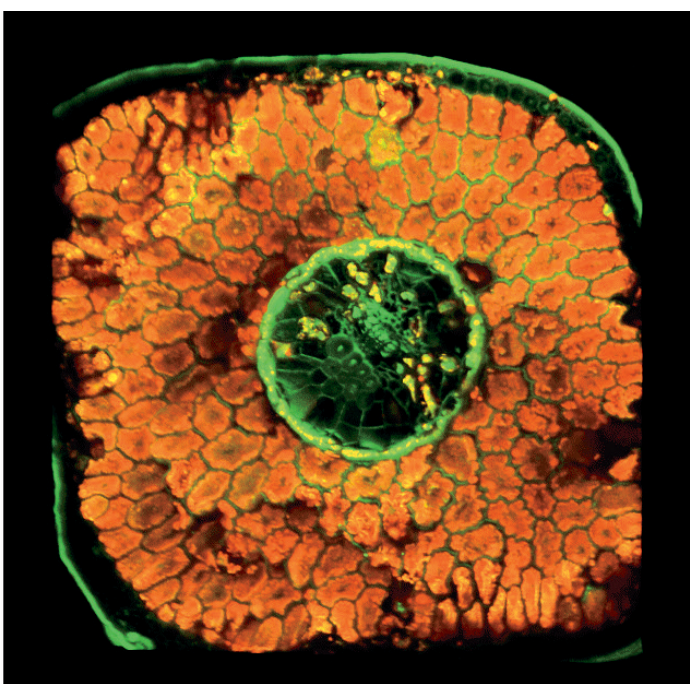
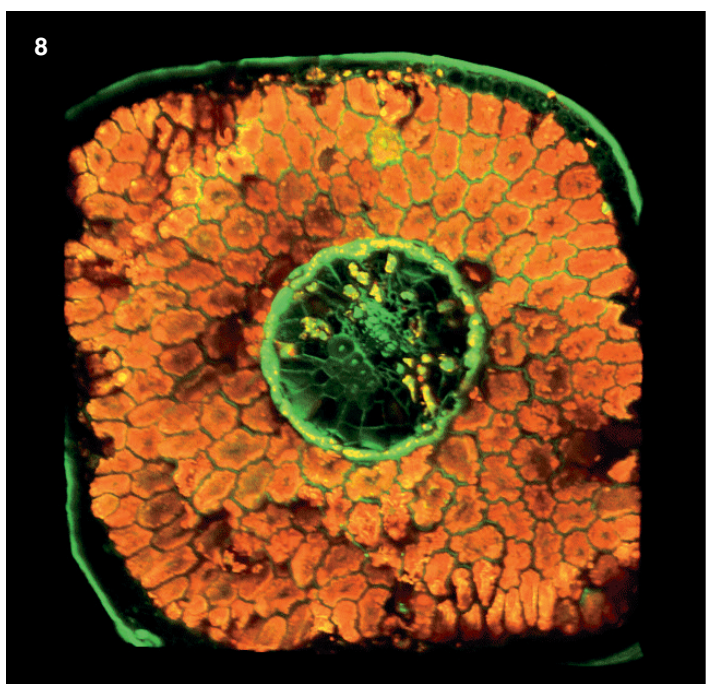
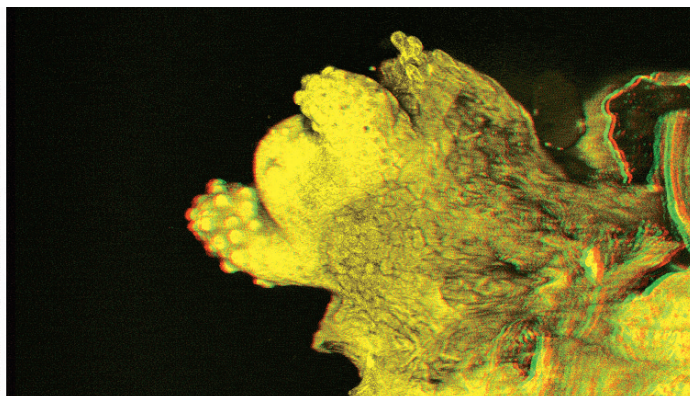
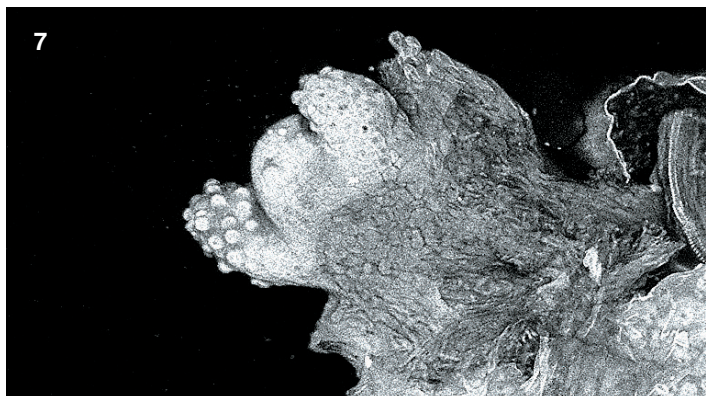
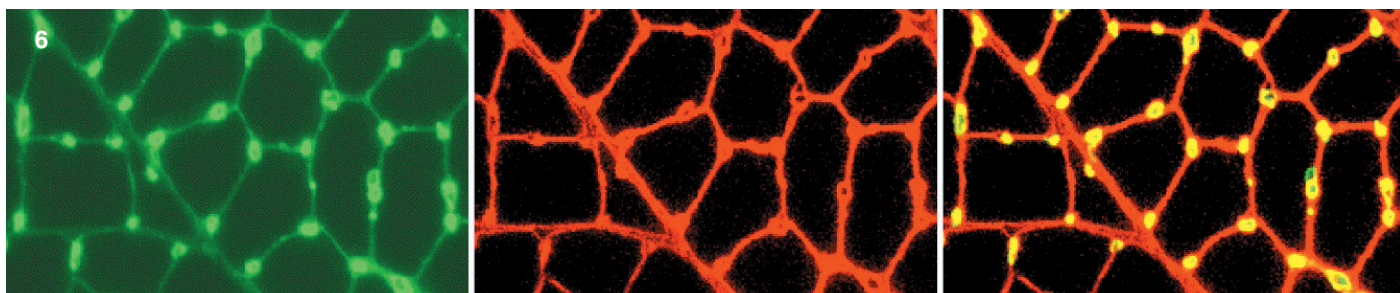
a obě jsou překryty přes sebe. Speciální brýle s barevnými skly pak zajistí, že jedním okem vidíme pouze zeleně obarvenou projekci, zatímco druhým pouze červeně obarvenou. Jiná možnost je položit vůči sobě natočené projekce vedle sebe (obr. 8) a buď zaostřením pohledu do nekonečna nebo speciálními brýlemi docílit splynutí levého a pravého obrazu a tím dostat obraz prostorový.

V případech vizualizace složitějších struktur vyvstává potřeba složitějších postupů jejich trojrozměrné rekonstrukce. Rozlišujeme dva typy trojrozměrných rekonstrukcí, a to rekonstrukce povrchu (surface rendering) a rekonstrukce objemu (volume rendering).

Při rekonstrukcích povrchu se generují trojrozměrné povrchy, které se osvětlují tak, aby vynikl jejich tvar (obr. 9 a 13). Vyžadují přesné vymezení povrchu objektu, což nemusí být vždy snadné. Neumožňují pohled na vnitřní strukturu zobrazeného objektu, ale je možné kombinovat rekonstrukce více objektů dohromady.

Rekonstrukce objemu jsou založeny na modelování průchodu paprsků zobrazovaným objektem. Umožňují tak znázornit i vnitřní stavbu objektu (obr. 10). Maximální projekce (obr. 7) vlastně patří do této třídy rekonstrukcí, přičemž jsou zde zobrazeny pouze obrazové elementy (tzv. voxely) s maximální hodnotou šedi podél dané

Obr. 4 Sériové tenké optické řezy vzrostným vrcholem rostliny merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*), získané konfokálním mikroskopem. Z celé série 27 optických řezů je ukázán 4., 8., 12., 16., 20. a 24. řez. Obrazy získány ve spolupráci s J. Albrechtovou z Přírodovědecké fakulty UK ♦ *Obr. 5* Optický řez lidskou placentou v hloubce 60 μm nasnímaný mikroskopem Leica TCS SP2 s využitím jednofotonové excitace (vlevo, klasické konfokální zobrazení) a dvoufotonové excitace (vpravo), kterou bylo docíleno ostřejšího a kontrastnějšího obrazu. Obrazy získány ve spolupráci s M. Jirkovskou z 1. Lékařské fakulty UK



Obr. 6 Vícenásobné imunofluorescenční barvení kosterního svalu krysy. Zeleně jsou obarveny stěny krevních vlásečnic (vlevo) fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 488 s využitím protilátek proti CD 31 a lektinu rostliny *Griffonia simplicifolia* z čel. bobovitých (*Fabaceae*), červeně navíc bazální membrány nacházející se ve stěnách svalových vláken (uprostřed) fluorescenčním barvivem Alexa Fluor 546 s využitím protilátek proti lamininu. Na překrytí obou obrazů přes sebe (vpravo) je možné pozorovat vzájemnou polohu „žlutých“ krevních vlásečnic a „červených“ stěn svalových vláken. Obrazy získány ve spolupráci s I. Erženovou a V. Čebaškovou z Univerzity v Lublani ♦ **Obr. 7** Maximální (vlevo) a anaglyfová projekce (vpravo, blíže v textu) 27 sériových optických řezů vzrostlým vrcholem rostliny merlíku červeného (viz také obr. 3)

Měření trojrozměrných mikroskopických struktur

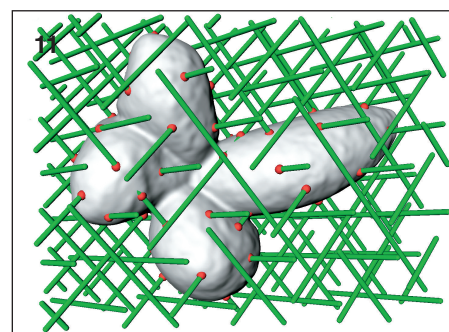
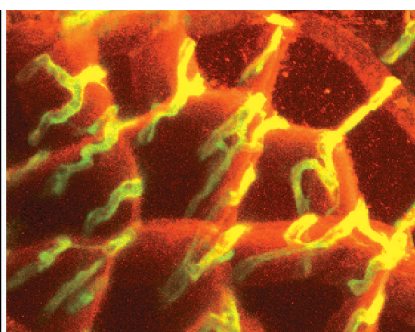
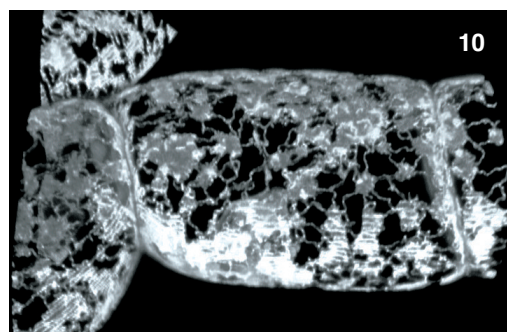
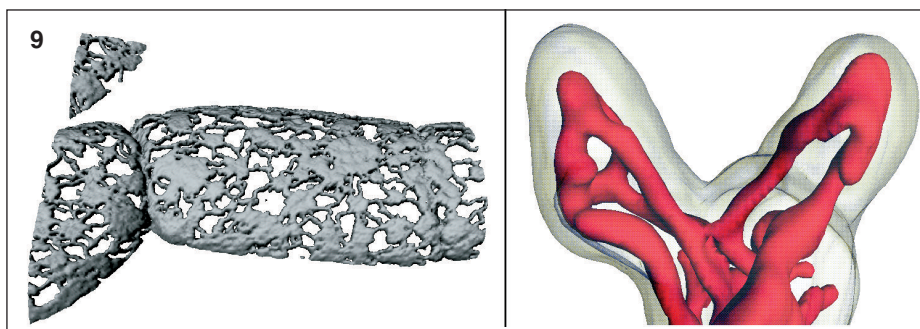
Využití sérií přesně slícovaných optických řezů pro trojrozměrné rekonstrukce objektů analyzovaných konfokálním mikroskopem je obecně známé, zatímco dosud ne plně doceněné zůstává použití konfokální mikroskopie při měření charakteristik struktury takovýchto objektů. Přitom při různých srovnávacích studiích může být kvantitativní měření (např. určení objemu či povrchu studovaného objektu či jeho složek) důležitější než vizualizace. Zde nacházejí uplatnění stereologické metody, které umožňují odvodit geometrické charakteristiky trojrozměrných objektů na základě proměření jen malých částí těchto objektů (např. řezů). Objem objektu lze odhadovat ze součtu ploch sériových řezů vedených objektem, vynásobeného vzdáleností mezi následnými řezy. Plocha těchto řezů je přitom úměrná počtu bodů testovacího systé-

Obr. 8 Stereobraz získaný projekcí série konfokálních řezů nasnímané ze 40 μm silného příčného řezu jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*). Byla využita autofluorescence chlorofylu a fenolických látek v buněčných stěnách. Obrazy získány ve spolupráci s J. Albrechtovou a Z. Lhotákovou z Přírodovědecké fakulty UK a s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR

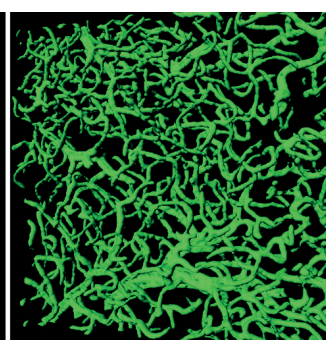
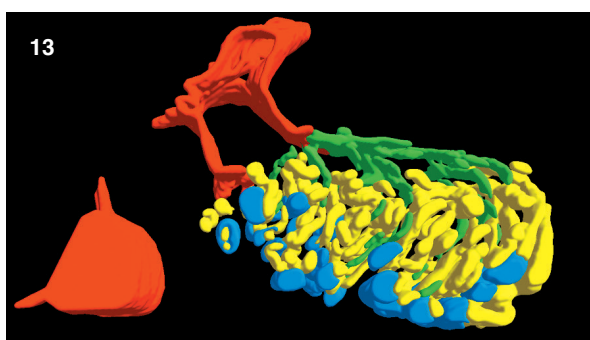
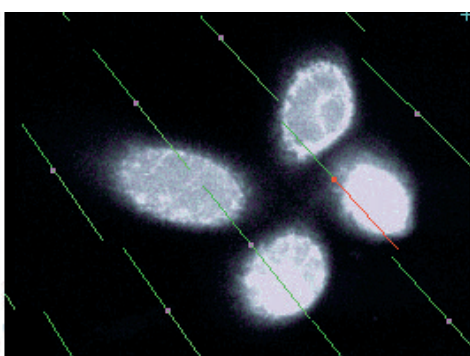
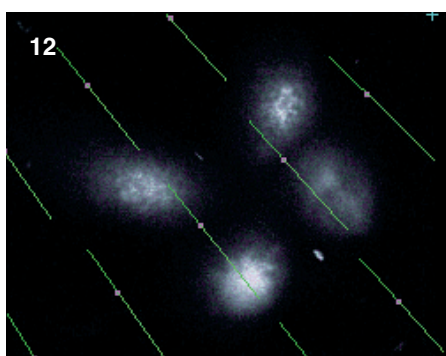
mu ležících v řezech, při měření objemu objektu tedy stačí na řezy přiložit bodovou mřížku a spočítat body, které leží v objektu. Na druhé straně obsah povrchu objektu lze měřit z počtu průsečíků povrchu s testovacími čarami, přičemž směr těchto testovacích čar musí být náhodný (izotropní).

V poslední době se ve stereologii stále více dostávají do popředí metody založené na proostřování tlustého fyzického řezu, které lze v zásadě aplikovat i na optické řezy získané v klasickém optickém mikroskopu. Konfokální mikroskop, poskytující mnohem ostřejší obraz optických řezů stu-

Obr. 9 Povrchová rekonstrukce endoplazmatického retikula tabákové buňky vizualizovaného pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (vlevo) a kapilárního řečiště v terminálních klících lidské placenty (vpravo). Obrazy získány ve spolupráci s K. Schwarzerovou z Přírodovědecké fakulty UK, M. Jirkovskou z I. Lékařské fakulty UK a s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR ♦ Obr. 10 Objemová rekonstrukce sítě endoplazmatického retikula tabákové buňky (vlevo, stejná výchozí data jako u obr. 9) a kosterního svalu krysy (vpravo, popis barvení viz obr. 6). Obrazy získány ve



spolupráci s K. Schwarzerovou z Přírodovědecké fakulty UK, I. Erzenovou a V. Čebaškovou z Univerzity v Lublani a dále s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR ♦ Obr. 11 Prostorová mřížka sestávající ze tří navzájem kolmých fakírských sond, které jsou vůči sobě „na půl cesty“ posunuty, použita k měření povrchu trojrozměrného objektu (trojrozměrná povrchová rekonstrukce tabákových buněk). Počet červeně vyznačených průsečíků mezi „zelenými“ fakírskými sondami a stěnami objektu je přímo úměrný obsahu povrchu objektu. Obraz získán ve spolupráci s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR a Z. Opatrným z Přírodovědecké fakulty UK ♦ Obr. 12 Použití fakírské metody pro měření povrchu tabákových buněk s využitím programu FAKIR. Na dvou optických řezech buňkami je vidět postup označování průsečíků mezi povrchem buněk a fakírskou sondou při postupném proostrévání buňkami. Testovací čáry jsou označeny zeleně, fialové body ukazují průsečíky mezi těmito čarami a daným optickým řezem. Jakmile se při procházení optickými řezy takový fialový bod dostane do styku s povrchem buňky, musí být označen myší jako průsečík testovací čáry s povrchem buňky (vlevo). Jeho barva se pak změní na červenou a průsečík se započítá. Počet všech vyznačených průsečíků je přímo úměrný obsahu povrchu buněk. Obrazy získány ve spolupráci s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR a Z. Opatrným z Přírodovědecké fakulty UK ♦ Obr. 13 Povrchová rekonstrukce embryonální kuřecí ledviny (vlevo, krevní zásobení vyznačeno červeně, sběrné kanálky a Wolffův vývod zeleně, sekreční kanálky žlutě a klubička modře) a kapilárního řečiště v kůře mozku krysy (vpravo). Obrazy získány ve spolupráci s J. Janáčkem z Fyziologického ústavu AV ČR, M. Jirkovskou z I. Lékařské fakulty UK, I. Náprstkovou z Ústavu experimentální medicíny AV ČR, J. Archambeau a X. W. Mao z univerzity v Loma Lindě, USA. Všechny snímky z archivu L. Kubínové



dovanou strukturou, je zde však stále více využíván. Lze tak např. u měření povrchu „obejít“ mnohdy omezující požadavek náhodné orientace řezů, protože náhodně orientované testovací přímkové se mohou generovat počítačem do série obrazů optických řezů. Takový postup se používá v metodě tzv. fakírské sondy (Kubínová

a Janáček, Journal of Microscopy 1998, 191: 201–211), která může sloužit k odhadu nejen obsahu povrchu, ale i objemu. Fakírská sonda je systém rovnoběžných přímk, připomínajících hřebíky zatlučené v lůžku fakíra. Obsah povrchu je úměrný počtu průsečíků fakírské sondy s povrchem objektu (pokud je orientace sondy znáhodněná) a jeho objem délce průniku fakírských sond s objektem. Např. při měření povrchu buňky si můžeme představit, že je buňka „propíchnuta hřebíky“ fakírské sondy a my spočítáme, kolikrát „hřebíky“ povrch buňky propíchnou. Účinnost metody se ještě zvýší, je-li aplikována kombinace tří navzájem kolmých fakírských sond, které jsou navíc vůči sobě „na půl cesty“ posunuty (obr. 11). Orientace prostorové mřížky přitom musí být náhodná (izotropní) v prostoru. To je možné zajistit speciálním počítačovým programem, který vytváří virtuální fakírské sondy a promítá je do sériových řezů povrchem. V průběhu měření jsou

sériové řezy postupně prohlíženy a průsečíky testovacích čar s povrchem se vyznačují myší (obr. 12).

Objem i povrch trojrozměrného objektu lze měřit také metodami využívajícími vhodné automatické algoritmy analýzy obrazu. Tyto metody lze sice plně automatizovat, avšak na rozdíl od interaktivních stereologických postupů vesměs vyžadují automatickou segmentaci studované struktury (tj. odlišení struktury od pozadí), která bývá u obrazů nasnímaných konfokálním či dvoufotonovým mikroskopem často obtížná.

Konfokální a dvoufotonové mikroskopy jsou neustále zdokonalovány, např. je zvyšována rychlost snímání, tedy mohou být zaznamenány stále rychlejší časové změny. Spektrum použití tohoto typu mikroskopie se v posledních letech výrazně rozšiřuje a jeho popularita stoupá v řadě oborů vědeckého zkoumání. O tom svědčí i vzrůstající zájem českých vědců o tyto techniky.