

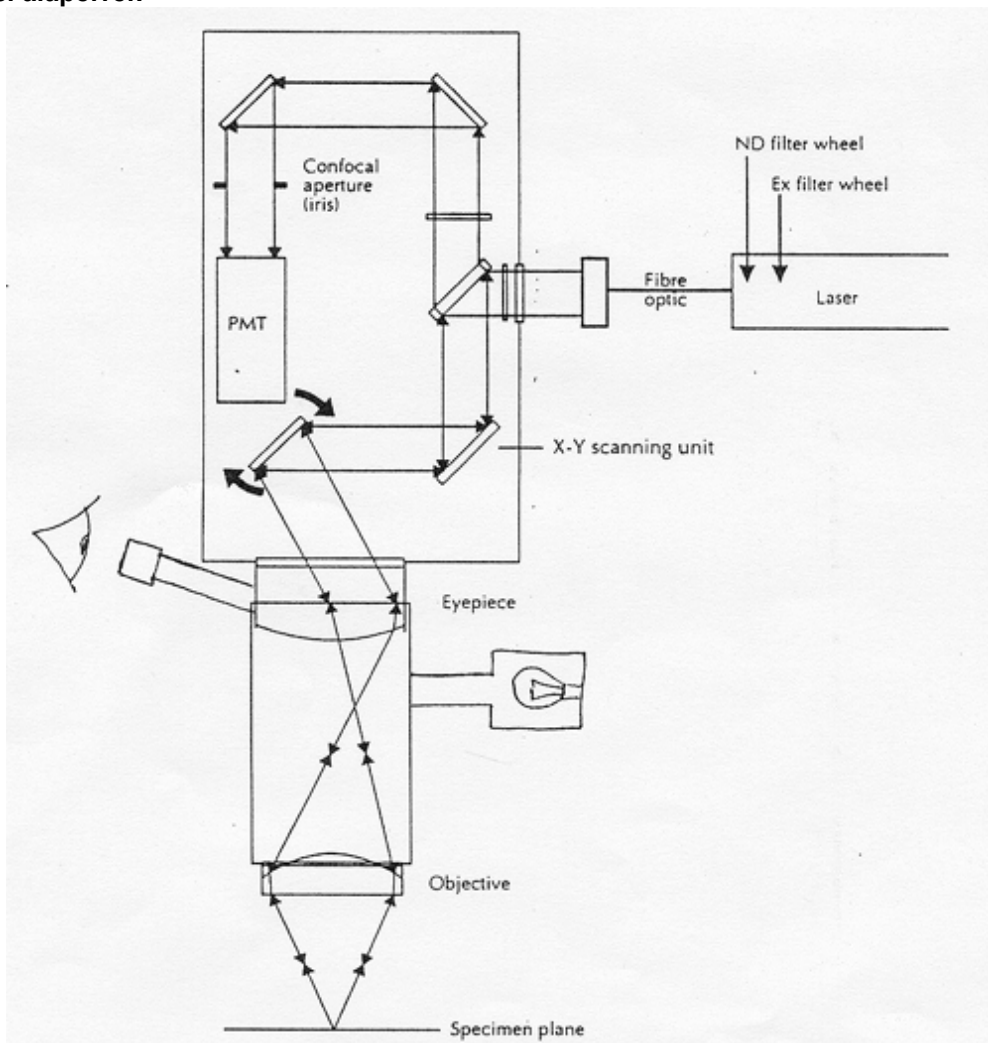
A KONFOKÁLIS LÉZER SCANNING MIKROSKÓPIA

Dr. Tímár József, Dr. Paku Sándor

Bevezetés

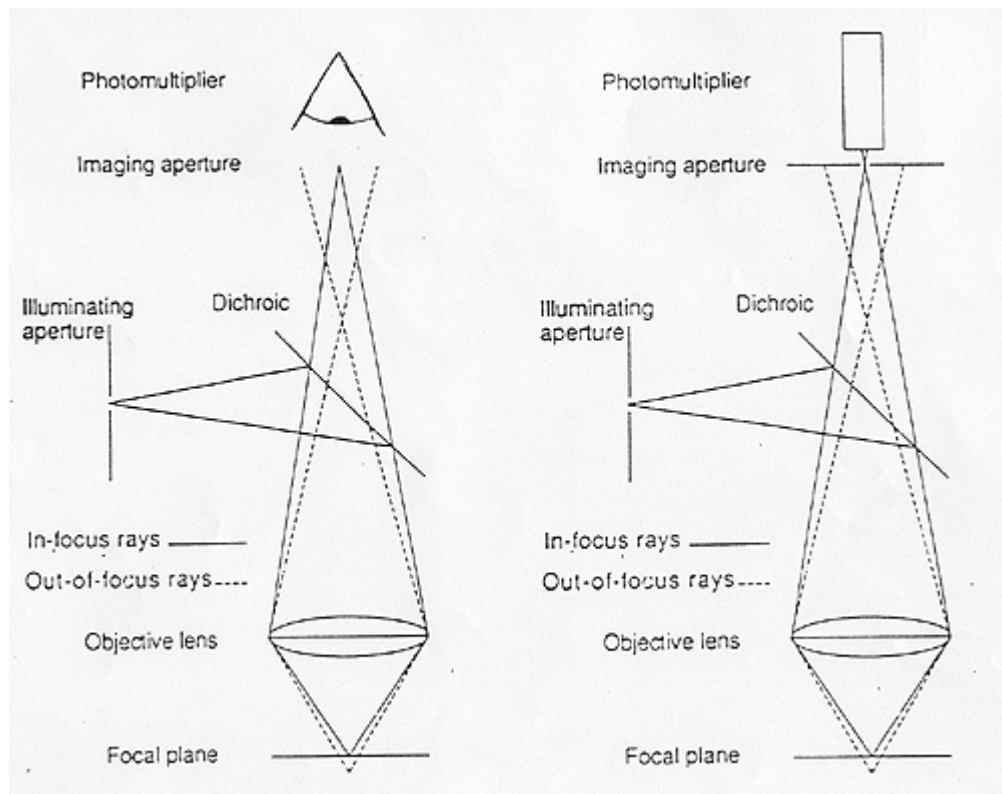
Régi törekvése a fénymikroszkópos morfológiának, hogy relatív egyszerűségét a lehető legsokoldalúbb és legnagyobb felbontású képi feldolgozás szolgálatába tudja állítani. Bár a hatvanas- hetvenes évek az ultrastruktúra korát hozta, melyben a sejtorganellum-szintű feloldóképesség lassan megközelítette a molekuláris dimenziókat, a készülék egyáltalán nem volt egyszerű és olcsó, és egyáltalán nem volt könnyen kezelhető, nem beszélve az előkészítés bonyolultságáról. Az immunitokémiai és hisztokémiai eljárások ugrásszerű fejlődése azonban az elektronmikroszkópot korábbi szinte egyeduralmú szerepéből visszaszorította az őt megillető helyre, az ultrastrukturális dimenziók megismerésének világába. Az elektronmikroszkóp fejlődésével párhuzamosan a sejtek vizsgálatára egy azzal szorosan kapcsolódó másik technikai is kifejlődött, scanning elektronmikroszkópia. Ez a technológia az elektronmikroszkóppal szemben a sejtet és szövetet a maga természetes háromdimenziós viszonyai között tanulmányozza annak minden előnyével és hátrányával együtt. Miután ebben az esetben csak indirekt módon lehet közvetlen információt nyerni a sejt belsejéről így elsősorban a sejtfelszín és sejtalak illetve sejt-sejt interakciók vizsgálatára váltott csak. Ebből is látható, hogy kialakult a sejtvizsgálatra alkalmas módszerek között egy kisebbfajta szakadék, amely az ultrastrukturális dimenziókat a fénymikroszkópos dimenziókkal összeköti, s amely ugyanakkor nem korlátozódik a sejtfelszínre, sejtalakra, hanem a sejt belsejének háromdimenziós viszonyait is képes vizsgálni a korábbi elektronmikroszkópos technikák előkezelési korlátai és nehézsége nélkül. Ennek a szakadéknak az áthidalására alkalmas az 1980-as évek második felében kifejlesztett un. konfokális mikroszkópos technika.

Működési alapelvek



1.ábra: A konfokális mikroszkóp sematikus felépítése

A konfokális lézer-mikroszkóp epilumineszcens lézer sugárnyalábot használ a minta vizsgálatára (stage vagy beam scanning). Ebben a mikroszkóp típusban az objektív lencse kondenzorként is működik egyben. A gerjesztő fény az 1. apertúrán át érkezik (10-100 mikron) a mintára, majd a mintából /-ről reflektáló fény a 2. apertúrába vetül, amely a fénynek csak egy részét (a fókuszban lévő részét) érzékeli és engedi egy nagy érzékenyséű detektorra (ideális esetben egy foton-számlálóra) (2. ábra). Emiatt a fókuszon kívüli területekről érkező fény a detektort nem gerjeszti, nem vesz részt a képképzésben. A kép tehát arról a képpontról keletkezik, amelyet a megvilágító fénynyaláb ért, és amely megegyezik a detektáló fénynyalábbal. A konvencionális fénymikroszkópokhoz képes a konfokális lézer scanning mikroszkóp laterális feloldása 1.7x-re nőhet ideális esetben. Ugyanakkor a rendszer igazi előnye a mélység-élesség drámai javulása az ún. *Konfokálitás*, amely az objektív lencse numerikus apertúrájával arányos és 1.5 NA körül már 0.1 μm lehet.



2. ábra: Működési elv (1. Apertúra = illuminating aperture; 2. Apertúra = imaging aperture)

Az alkalmazási lehetőségek spektruma

A konfokális lézer-mikroszkóp orvosbiológiai felhasználása elsősorban a fluoreszcens technika magas színvonalú alkalmazását jelenti, bár nem elhanyagolható szerepe a hagyományos mikroszkópos képképzés kiváltásában, mint a fázis-kontraszt, a sötétlátóterés interferencia-mikroszkópia vagy a konvencionális transzmissziós mikroszkópia. Ez utóbbi technikák esetében festetlen objektumokat (sejtet vagy szövetet) lehet vizsgálni. A kettős vagy többes jelölések rutinszerű alkalmazása a rendszer legnagyobb előnye. A hagyományos argon/krypton lézert uv lézerral kiegészítve három gerjesztő fénysugár áll rendelkezésre három párhuzamos fluoreszcens szignál detektálására. A képet mintegy negyedik információként az átmenőfényes, fáziskontraszt vagy sötétlátóterés kép egészítheti ki. A konfokális lézermikroszkóp az ún. natív sejt és szövetminták vizsgálatának ideális eszköze, ahol a konfokálitás a fluoreszcens képeken valósul csak meg. Az alábbiakban megkísérlem felvázolni a készülék tipikus alkalmazási lehetőségeit, előrebocsátva, hogy a technika nem része a mindennapi rutin diagnosztikának ugyanakkor egyre inkább a technológia minimumává válik a fénymikroszkópos sejt- és szövetanalízisnek.

Mintaelőkészítési szempontok

A konfokális mikroszkópia, miután natív sejtek, szövetek vizsgálatát jelenti, így ennek megfelelően ilyen esetekben nem igényel más előkészítést (natív élő sejteket, illetve a szövetek fagyasztott metszeteit). Amennyiben immuncitokémiai módszereket alkalmazunk, az előkészítés szempontjai az optimális immunreakciók igényeinek illetve a finom-morfológia maximális megőrzésének egészséges kompromisszumát kell hogy jelentse. Gyakorlatilag az elektronmikroszkópia fixáló módszerei azon részének alkalmazását kell hogy jelentse, amely egyúttal alkalmas az optimális immunreaktivitás megőrzésére is.

Felhasználás prototípusok

1./ *Sejtfelszíni topológia*

Adherens és nem-adherens sejtek apikális felszínén a felszíni antigének és receptorok eloszlásának kimutatására ideális a konfokális lézermikroszkóp. A párhuzamosan készített fáziskontraszt kép a scanning elektronmikroszkópos feloldáshoz közelítve a sejt felszíni nyúlványait, membrán-egyenetlenségeit, illetve ún. perifériális membrán egységeit, mint a vezető lamella, húzó-él, képes megjeleníteni a receptor(ok)-hoz viszonyítva. Egy néhány m magas sejt esetében a mátrix-közeli membrán és az apikális membrán receptor fenotípusának jellemzése más módszerrel gyakorlatilag elképzelhetetlen. A jelölés élő sejten alkalmazva kiválóan alkalmas a membrán receptor-dinamika tanulmányozására (intemalizáció vagy membránban történő transzlokáció).

2./ *Adhéziós organellum vizsgálata*

Az adherens sejtek a mátrixszal az ún. adhéziós plaque-ok révén lépnek kapcsolatba. A struktúrák "magassága" maximum néhány tized mikron, így hagyományos mikroszkópban csak kivételesen lapos sejtekben lehet tiszta képet kapni egyes elemeiről, mivel a struktúrákra rávetül egy igen vastkos és immunreaktív citoplazma. Megfelelően finom permeabilizálás alkalmazása és megfelelő immunjelölés esetén az optimális optikai szeletben gyakorlatilag csak az adhéziós organellumok síkja más struktúrák zavaró hatása nélkül mutatható ki.

3./ *Sejtmagi struktúrák vizsgálata*

Akár egyedi sejtekről, akár szövet metszetekről van szó, a sejtmag a konfokális technika ideális organelluma. A sejtmag nagysága (5-10-15 μm), még szövetmetszetek esetében is lehetőséget ad arra, hogy a metszetben az egész organellum egészében vizsgálható legyen. A megfelelően vékony optikai szeletelés igen nagy felbontást, a 3 dimenziós rekonstrukció pedig a struktúra utólagos térbeli rekonstrukcióját teszi lehetővé. A nukleinsavak kimutatására számos különböző hullámhosszon gerjeszthető és fluoreszkáló fluorokróm áll rendelkezésre, melyek jól kombinálhatók a különböző specificitású protein próbákkal. A magi struktúrák esetében külön kell megemlíteni a kromoszómák és gének in situ vizsgálatát, ami a modern molekuláris biológiának igen gyakori tárgya. A fluoreszcens in situ hibridizáció segítségével, amennyiben a kromatint egy adott fluorokrómmal jelöljük, akár többszörös gén vagy mRNS kimutatására van lehetőség és ezek egymáshoz, illetve a kromoszóma adott régióhoz viszonyított elhelyezkedése nagy pontossággal tanulmányozható.

4./ *Élő sejtek vizsgálata: sejtmagi illetve supravitalis festés/ jelátvitel*

A kisebb energiájú lézereket alkalmazó scanning mikroszkópokban lehetőség van arra, hogy a jelet élő sejtekből nyerjük. Ennek feltétele a fűthető tárgyasztal alkalmazása. Ez esetben a sejtekről pl. átmenő lézerefényes képeket készíthetünk előre beprogramozott módon mint a time-laps videomikroszkóppal, majd a képeket egymásután lejátszva a sejten belüli folyamatokat illetve a sejt változásait mintegy mozi formájában játszhatjuk.

Az élő sejten belüli jelátvitel tanulmányozására megfelelő specificitású supravitalis festékekkel lehet azokat jelölni és a fluoreszcens csatornában lehet megadott időnként mérni a fluoreszcencia lokalizációját és intenzitásának változását.

5./ Szövetmetszetek vizsgálata

A fénymikroszkópia állandó törekvése hogy egyre vékonyabb metszeteket készítsen és azokban analizálja a struktúrákat. A konfokális technika előnye, hogy nem igényel igazán vékony metszeteket, hiszen éles képet úgyis csak az adott optikai síkból képez. Ugyanakkor a vékony metszetekben a szöveti struktúrák térbeli elhelyezése nehézkes sokszor igen félrevezető. A konfokális mikroszkóp lehetővé teszi, hogy vastag metszeteket alkalmazzunk (50-100 µm), amelyekben azonban mintegy optikai úton szeleteljük a szövetet és így nyerünk az individuális szeletekről képet, amelyekben aztán utólagosan digitálisan rekonstruálhatjuk az egyes jelek, sejtek, organellek térbeli tényleges elhelyezkedését, más struktúrákhoz való viszonyát.

6./ Molekuláris biológia speciális alkalmazási területei: DNS-chip és lézer mikrodisszektor

A konfokális lézer scanning mikroszkópiának igen nagy előnye hogy automatizálható, amit számos területen lehet felhasználni. Ezek közül manapság sok szó esik a DNS-chip technikáról, de arról nem hogy ennek egyik instrumentális alapja a konfokális mikroszkóp. A DNS-chipen elvégzett fluoreszcens hibridizációs reakciót egy (kis felbontású) konfokális lézer-mikroszkóp olvas le, s miután képe azonnal digitalizált, az analizáló program számára azonnal hozzáférhető adatokat hoz létre. A készülék adottságai ezen technika maximálisan kihasználja a többszörös fluoreszcens jelölések esetében. A készülék specificitása az automatizált tárgyasztal, mely az automatikus leolvasás feltétele. Nem véletlen, hogy a DNS-microarray rendszerben a leolvasó berendezés ára nagyságrendileg megegyezik egy konfokális mikroszkóp árával.

A modern molekuláris technológia egy másik területen is felhasználja a konfokális lézer mikroszkópot. A szövetminta-homogenizátumokból nyert DNS és RNS minták nem egységes sejtpopulációból származnak így a nyert adatok csak ennek figyelembe vételével értékelhetők. Újabb lehetőség van arra, hogy egy adott szövettani preparátumban azonosított akár egy sejt magjából nyerjünk DNS vagy RNS mintát, a lézer mikrodisszektor segítségével. Itt kellően vastag metszetben a mikroszkóp ellenőrzése mellett ki lehet vágni, és fel lehet fogni a vizsgálandó organellet az azonosított sejtből. A technikát lézer scanning mikroszkóppal kombinálva még akár funkcionális státusz alapján is lehet szelektíven gyűjteni.