

Mikroskopija, ki presega meje optične ločljivosti

Marko Kreft, Jernej Jorgačevski

Optična mikroskopija se uporablja za raziskovanje strukture in funkcije celice. Med uveljavljene različice optične mikroskopije sodi konfokalni mikroskop. To je fluorescenčni mikroskop, s katerim lahko opazujemo vsako optično ravnino objekta posebej. Taka slika je trirazsežna, z dobrim kontrastom. Ločljivost take slike je zaradi lastnosti svetlobe omejena na 200 nanometrov. Pred kratkim smo v Ljubljani zgradili mikroskop STED (angleško: **ST**imulated **E**mission **D**epletion, kar pomeni »vzbujeno praznjenje emisije«), ki presega to omejitev ločljivosti.

Omejitev ločljivosti fluorescenčnih mikroskopov

Mikroskop je nepogrešljivo orodje za raziskovanje celic. Velika večina celic je prozornih. Vidimo jih le, če mikroskop izkoristi več fizikalnih lastnosti svetlobe. Za delovanje posamezne steklene leče, mikroskopa in fotografskega objektivja je ključen pojav lom svetlobe. Nekateri mikroskopi pa izkoriščajo še odboj, polarizacijo, uklon in interferenco svetlobe. Največkrat pred opazovanjem z mikroskopom celice obarvamo. Tako lahko izkoristimo še absorpcijo svetlobe in fluorescenco.

Fluorescenca je pojav, pri katerem ob absorpciji fotona elektroni v atomih fluorescentne snovi (fluorokroma) preidejo v višje energijsko stanje. Pri vrnitvi elektronov v osnovno stanje se izseva svetloba, ki ima daljšo valovno dolžino od svetlobe vzbujanja. Poglavitna hiba običajnih fluorescenčnih mikroskopov je, da ostro sliko fluorescence predmeta v eni ravnini zamegli neostra slika ozadja. Čim debelejši je predmet, bolj meglena je slika. To pomanjkljivost odpravlja konfokalni mikroskop. Konfokalni

mikroskop loči svetlobo, zbrano iz opazovane ravnine, od svetlobe ozadja. Zato lahko z optičnim rezanjem iz globine tkiv izluščimo bolj jasne slike. Konfokalna mikroskopija je zato postala uveljavljena tehnika v celični biologiji in fiziologiji. Ločljivost običajne in konfokalne fluorescenčne mikroskopije je omejena zaradi uklona svetlobe, in sicer na približno polovico valovne dolžine. To omejitev je leta 1873 odkril in pojasnil nemški fizik Ernst Abbe. Skupaj z Ottom Schottom je pomembno prispeval k uspehu podjetja, ki ga je vodil Carl Zeiss in ki deluje še danes.

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

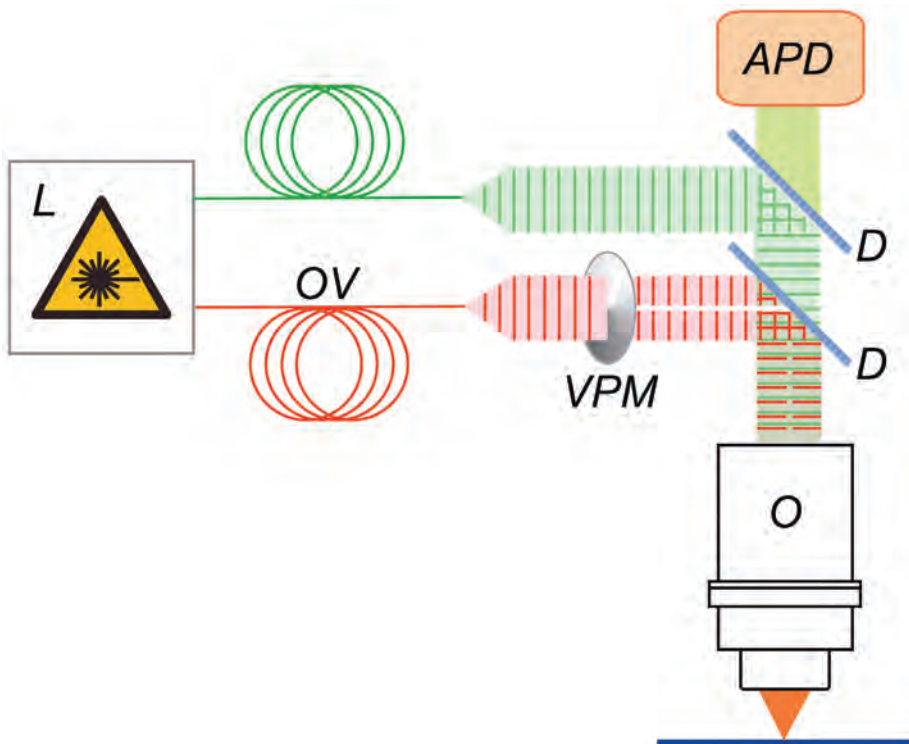
Ernst Abbe je leta 1873 pojasnil omejitev ločljivosti optičnih mikroskopov (d). Ločljivost je odvisna od valovne dolžine svetlobe (λ), lomnega količnika snovi, v kateri je objekt opazovanja (n) in sinusa vpadnega kota svetlobe v objektiv (α). Danes lahko z mikroskopom STED to teoretično omejitev zaobidemo.

Fluorescenčni mikroskop STED (vzbujeno praznjenje emisije) omogoča preseganje omejitve ločljivosti

Stefan W. Hell si je leta 1994 zamislil, leta 1999 pa tudi zgradil mikroskop, ki presega Abbejevo omejitev ločljivosti. Mikroskop

je temeljil na zamisli, da lahko s svetlobo zmotimo običajni proces fluorescence. Po vzbujanju elektroni preidejo v višje energijsko stanje, nato pa se kmalu spontano vrnejo v osnovno stanje in pri tem atomi izseva-jo fluorescenčno svetlobo. Z močno svetlobo lahko sprožimo predčasno izsevanje fotona. Fluorokrom, ki je prisiljeno izseval foton, se deaktivira in ne more priti do spontane fluorescence. Fluorokromi prisiljeno oddajo fotone, preden bi jih oddali spontano. Taki fotoni imajo daljšo valovno dolžino od fluorescenčne svetlobe in imajo isto smer kot svetloba, ki je prisiljeno izsevanje povzročila – stran od objektiva. Zato lahko prisiljeno in spontano izsevanje ločimo z uporabo izredno močnih laserjev za vzbuditev tega procesa. Mikroskopijo so poimenovali z angleškim akronimom STED (STimulated Emission Depletion), kar pomeni »vzbujeno praznjenje emisije«.

Naključno polarizirana laserska svetloba je že v laserju (L) razcepljena v dva curka, ki ju vodimo v dve ločeni optični vlakni (OV). Z dvema dikroičnima zrcaloma (oznaka D; tako zrcalo prepušča določene valovne dolžine, druge pa odbije) curka usmerimo skozi objektiv (O). Luknjo v sredini žarka STED povzroči posebna optična komponenta (VPM, vortex phase mask), ki povzroči polarizacijo curka svetlobe v obliki vijajnice od 0 do 360 stopinj. Za detektor fluorescenčnega signala uporabimo plazovno fotodiodo (APD, avalanche photodiode). Mikroskop, ki je posebej razvit za naše raziskave celične fiziologije, ima vse optične komponente podvojene in tako omogoča sočasno snemanje dveh kanalov pri dveh različnih valovnih dolžinah (valovni dolžini vzbujanja sta 570 nanometrov in 650 nanometrov, valovni dolžini za STED pa 710 nanometrov in 745 nanometrov). Tako lahko merimo časovno odvisno zgradbo dveh fluorescenčnih struktur z nanometriško ločljivostjo. Ilustracija: Marko Kreft.



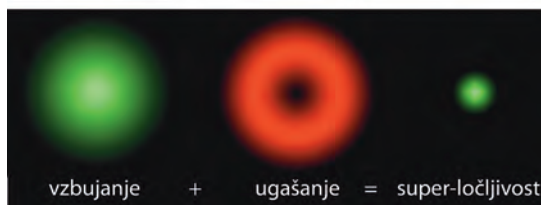
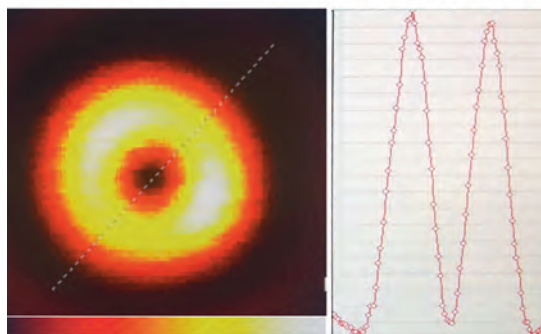
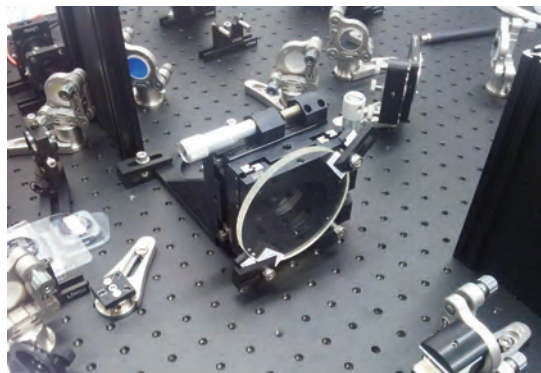
Z izrabo učinka STED lahko laserski curek ostro ošilimo. Tako omejimo oddajanje fluorescenčne svetlobe le na zelo majhno območje, mnogo manjše od območja, ki bi ga zaradi uklona sicer osvetljevali z laserjem. Za uspešen učinek STED moramo vzbujanje fluorescence in njeno ugašanje časovno natančno uskladiti. Zato fluorescenco vzbujamo z nizom laserskih bliskov. Drugi niz laserskih bliskov pa fluorescenco ob robu sproti ugasne. Drugi niz bliskov ima v sredini drobno vrzel svetlobe. Laserski curek ima torej obliko plašča, v vzorcu pa osvetljuje območje oblike venca ali kolobarja. Bliski svetlobe STED so časovno ločeni od bliskov vzbujanja le za nekaj pikosekund.

Fluorescenca v vzorcu uspešno nastane le v središču votlega curka svetlobe STED, ki ima v preseku obliko kolobarja ali venca. Premer te vrzeli je mnogo manjši od premera curka za osvetljevanje, tako je območje uspešne fluorescence močno omejeno (ošiljeno), kar omogoča sestavljanje slike s superločljivostjo. Mikroskop sestavi celotno sliko tako, da usklajeno premika oba (sno-pa) curka svetlobe po preparatu, računalnik pa beleži jakost svetlobe fluorescence v teh posameznih drobnih fluorescenčnih točkah.

Kakšno ločljivost lahko dosežemo?

Mikroskopija STED nima nobene načelne omejitve ločljivosti. Z močnejšimi laserji dosegamo višje ločljivosti:

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}}$$



V curek svetlobe za STED naredimo luknjo s posebno optično komponento (vortex phase mask, stekleni disk na zgornji sliki), ki povzroči polarizacijo curka svetlobe v obliki vijajnice od 0 do 360 stopinj. Zato vidimo na sliki namesto pike venec svetlobe. Profil jakosti na desnem grafu kaže, da je luknja v sredini zelo temna in bo omogočila pojav fluorescence le v prostorsko močno omejenem delu slike. Na spodnji shemi vidimo, da z ugašanjem dosežemo ošiljeni curek svetlobe, kjer pride do vzbujanja fluorescence. Tako je dosežena ločljivost, ki je boljša od ustrezne optične (superločljivost). Foto: Marko Kreft, ilustracija: Jernej Jorgačevski.

Enačba je podobna Abbejevi, le da je v imenovalcu ulomka dodan člen, ki opisuje učinkovitost STED-a. I je jakost laserske svetlobe STED, I_s pa je jakost (intenziteta) svetlobe STED, ki ugasne polovico vseh fluorokromov. Običajno je jakost I_s približno 20 megawattov na kvadratni centimeter (MW/cm^2). Tako visoke jakosti lahko povzročijo bledenje barvil. Bledenje je še posebej močno, če svetloba vzbuja molekule, ki so v tripletnem stanju. Singletno stanje elektronov je takrat, ko so vsi elektroni sparjeni in imajo nasprotni spin. Taki sta osnovno in vzbujeno stanje. Tripletne stanje pa je takrat, ko ima en par elektronov enak spin. Bledenju se izognemo tako, da pari pulzov svetlobe prispejo do fluorokromov v intervalih, ki so daljši od časa relaksacije tripletnih stanj. Tripletne stanja lahko imenujemo tudi temotna stanja, čase relaksacije pa poimenujemo T-Rex (ang. Triplet-state relaxation). Čas takega stanja je običajno nekaj mikrosekund, zato uporabimo laserje z bliski, ki si sledijo s frekvenco nekaj megahertzov (MHz). Tako se fluorokromi vsakokrat ponovno vzbudijo šele, ko se tripletne stanje povrne v osnovno stanje in so fluorokromi pripravljani za novo vzbujanje.

Visokofrekvenčno vzbujanje, ki je sinhronizirano z visokofrekvenčnim laserjem STED, je zahtevalo zapletene in drage titan-safirske laserje z napredno povezavo med dvema laserjema. Že samo tak sistem za osvetljevanje dosega ceno pol milijona evrov. Tak sistem je izvedljiv s kratkimi svetlobnimi bliski, ki trajajo manj kot eno pikosekundo (ps), za učinkovit učinek STED pa jih je bilo treba podaljšati za stokrat. To časovno podaljševanje je zahtevalo dodatno zapleteno nelinearno optiko.

V zadnjem času so razvili laserje s sevajočim medijem v optičnem vlaknu. Taki laserji oddajajo svetlobo različnih valovnih dolžin. Zato takim laserjem lahko rečemo tudi beli laserji. Gostota moči presega 1 miliwatt na nanometer (mW/nm), bliski svetlobe pa

si sledijo s frekvenco več megahertzov. Za učinek STED lahko uspešno uporabimo območja valovnih dolžin širine 20 nanometrov, tako ima lahko posamezni blisk energijo 20 nanojoulov (nJ). Ko tak blisk z objektivom usmerimo na majhno površino preparata, manjšo od kvadratnega mikrometra, je gostota svetlobne moči kar več gigawattov na kvadratni centimeter (GW/cm^2). Če bi torej s tako gostoto moči želeli stalno osvetljevati kvadratni centimeter površine, bi potrebovali moč, ki jo oddajajo vse elektrarne v Sloveniji. Laserji so pulzni in osvetljujejo preparat le zelo kratek čas. Svetloba je usmerjena v le eno drobno točko hkrati. Kljub temu dosejajo zadostno moč za učinek STED le v rumenem in rdečem delu spektra, zato za fluorescenčno označevanje mikroskopskih vzorcev izbiramo temu primerne fluorokrome. Čas trajanja pulza takih belih laserjev je okrog 100 ps. Bliski laserske svetlobe za STED in za vzbujanje fluorescence so popolnoma sočasni, saj izvirajo iz istega laserja. Potrebni časovni zamik bliskov STED pa nastavimo s preprostim podaljševanjem optične poti, na primer z vstavljanjem določene dolžine vmesnih optičnih vlaken.

Mikroskopija STED v Sloveniji

Pred dvema letoma smo v sodelovanju s Stefanom Hellom, Claudio Geisler in Alexandrom Egnerjem iz nemškega Laser Laboratorium Goettingen začeli z izgradnjo dvo-kanalnega mikroskopa STED za hitre fiziološke meritve. Gradnja je potekala okviru Centra odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP) in nacionalnega raziskovalnega programa za celično fiziologijo, ki ga vodi akad. prof. dr. Robert Zorec. Razvoj in gradnja sta se začela v Goettingenu v Nemčiji, pred kratkim pa sta se zaključila v Ljubljani. Mikroskop je nameščen v Referenčnem centru za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

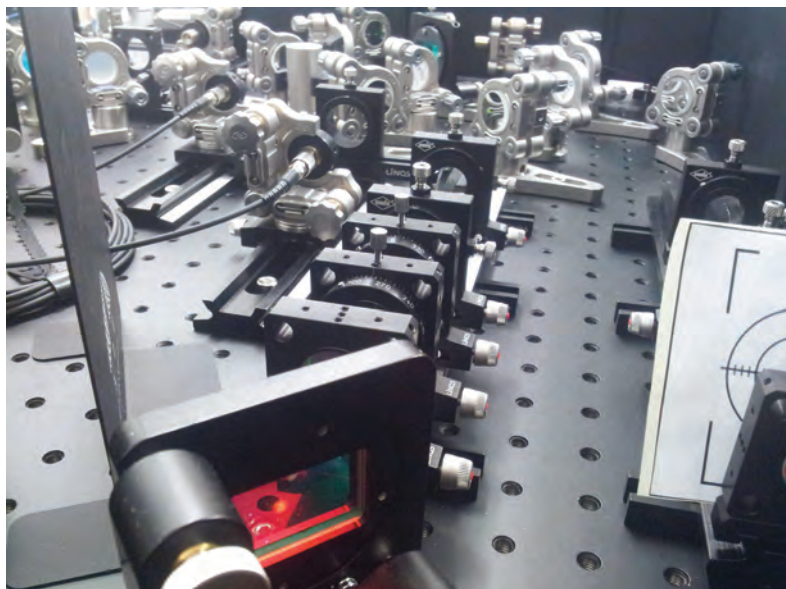


Izgradnja dvokanalnega mikroskopa STED. Foto: Marko Kreft.

Uporabili smo laser, ki je bil razvit po naročilu v britanskem podjetju Fianium. Glavni oscilator laserja sproži pulz svetlobe vsakih 50 ns, čas trajanja pulza pa je 100 ps. Taka neobdelana svetloba laserja je že primerna za STED. Isti oscilator uravnava proženje svetlobe za STED in vzbujanje, zato sta ti dve svetlobi že sinhroni. Laser ima tri izhode, en izhod je za svetlobo vzbujanja (beli laser z valovnimi dolžinami od 450 do 2000 nanometrov), dva izhoda pa za svetlobo ugašanja fluorokromov (710 nanometrov in 745 nanometrov). Curek belega laserja smo z dikroičnimi zrcali in filtri razdelili na dva curka z valovnima dolžinama 570 nanometrov in 650 nanometrov. Poleg po naročilu razvitega laserja ta kompleksni sistem sestavlja še 297 različnih tipov komponent, od

enostavnega nosilca za lečo do fluorescenčnega mikroskopa.

Za doseganje kar največje ločljivosti pri dani moči laserjev je bistveno, da sta laserska žarka za vzbujanje in praznjenje stanj dobro naravnana, da se prekrivata. Že najmanjši premiki optičnih komponent zaradi temperaturnega raztezanja in posedanja povzročijo slabšanje kakovosti slike. Zato vsak dan pred meritvami izvedemo uravnavanje prekrivanja laserskih žarkov v treh razsežnostih. Poleg tega moramo pred meritvami preveriti tudi, ali izsevana fluorescenca natančno zadene vhod detektorja. Vse komponente našega mikroskopskega sistema so podvojene, da dosežemo dvobarvno sliko. Prve meritve z mikroskopom STED smo



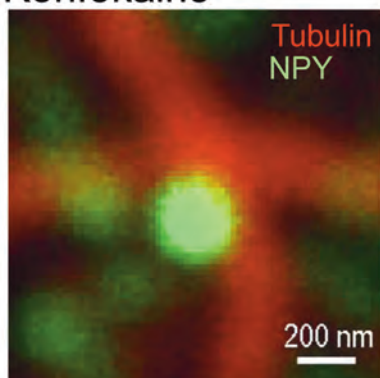
Del mikroskopa STED, kjer lahko vidimo številne sestavne optične elemente: dikroično zrcalo (rdeče osvetljeno), ki mu sledijo polarizatorji, zrcala in optično vlakno (zvitke na levi). Foto: Marko Kreft.

opravili na astrocih, kjer smo želeli določiti premer mešičkov, ki vsebujejo signalne molekule. Astrociti so celice gljive v možganih, ki vplivajo na prenos informacije v

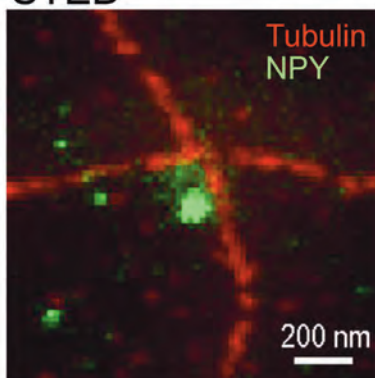
sinapsah. Kemični prenašalci se z mehанизmom eksocitoze iz mešičkov izločajo v sinaptično špranjo. Kemične prenašalce v celicah gljive imenujemo gljivini prenašalci

Primerjava konfokalne mikroskopije in mikroskopije STED. Na sliki vidimo del astrocita (tip celic v možganih), ki je bil označen s fluorescentnimi protitelesi proti tubulinu (rdeča) in proti neuropeptidu Y (zeleno). Tubulin je molekula v mikrotubulih, ti pa so del citoskeleta. Citoskelet ima pomembno vlogo pri različnih celičnih funkcijah, med drugim služi tudi kot tračnica za transport mešičkov po celici. Mešički vsebujejo različne signalne molekule, ena izmed njih je tudi neuropeptid Y. Na izsekih konfokalne slike in slike STED opazimo razliko v ločljivosti med obema tehnikama. Zeleno so obarvani mešički, rdeče pa mikrotubuli. Avtorja mikroskopske slike: Jernej Jorgačevski, Claudia Geisler.

Konfokalno



STED



(glijatransmiterji), podobno kot živčni prenašalci (nevrotansmiterji), ki se izločajo iz nevronov. Z elektronsko mikroskopijo so izmerili, da so premeri mešičkov od 30 do 700 nanometrov. Ločljivost fluorescenčne mikroskopije, vključno s konfokalnim mikroskopom, je zaradi uklona svetlobe omejena na 200 nanometrov. Z mikroskopom STED smo izmerili premere mešičkov od 40 do 400 nanometrov. Te meritve so bile povsem primerljive z meritvami z elektronsko mikroskopijo. Pri tako visoki ločljivosti moramo tudi upoštevati, da smo za označevanje uporabili specifična protitelesa, ki dodatno povečajo izmerjene premere mešičkov. Ti poskusi so torej pokazali, da se mikroskopija STED lahko za slikanje bioloških vzorcev precej približa ločljivosti elektronske mikroskopije. Biološke vzorce moramo pred

slikanjem z elektronskim mikroskopom primerno pripraviti, zato živih tkiv in celic ni mogoče slikati. Za spremljanje fizioloških procesov snemamo časovno sliko dogajanja v živih celicah. Mikroskop STED omogoča raziskave bioloških procesov s superločljivo-stjo.

Literatura:

- Jorgacevski, J., Potokar, M., Grilc, S., Kreft, M., Liu, W., Barclay, J. W., Bückers, J., Medda, R., Hell, S. W., Parpura, V., Burgoyne, R. D., Zorec, R., 2011: *Munc18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties. The Journal of Neuroscience*, 31: 9055-9066.
- Hell, S. W., 2007: *Far-Field Optical Nanoscopy. Science*, 316: 1153-1158.
- Wildanger, D., Rittweger, E., Kastrup, L., Hell, S. W., 2008: *STED microscopy with a supercontinuum laser source. Optics Express*, 16: 9614-9621.

Ali je bil Lažnivi Kljukec geolog? • Iz zgodovine geologije

Ali je bil Lažnivi Kljukec geolog?

Mihael Brenčič

V zakladnici slovenskih ljudskih pregovorov bomo našli številne reke, povezane z lažjo. Na primer: »Laž ima kratke noge« ali pa »Kdor laže, ta krade«. Naša vzgoja nam prepoveduje, da bi lagali. Če nam kdo laže, nas to prizadane ali pa ima celo hujše posledice v naših medčloveških odnosih. A laž, kako nenavadno, je lahko tudi sproščujoča. Kdo med nami ni poslušal svojih dedov ali starejših sorodnikov, ki so pripovedovali zgodbe iz svoje mladosti, v katerih se je vse kadilo in na veliko pokalo, v katerih so nastopali kot veliki osvajalci ženskih src in v katerih se je sploh veliko dogajalo? V pripovedi smo uživali, se smejali in včasih zmajevali z glavo, ko pa smo se, ko je čar pripovedovanja ugasnil, začeli o zgodbi spraševati, smo ugotovili, da se v njej skriva le droben oko-

stnjak resnice, ki je obložen z debelo mastjo laži. Navidezne laži in pretiravanja so način, s katerim pisatelji skušajo pogosto pritegniti bralca, pri pisanju se poigravajo z ozko mejo med resničnostjo in domišljijo, med opisom navidezno resničnih dogodkov in popolnimi izmišljijami. Takšnih del bomo v svetovni literaturi našli veliko. Nekatera so pozabljena, druga še danes, po desetletjih, od kar so nastala, privlačijo staro in mlado. Mednje sodi tudi delo z baročno dolgim naslovom *Čudovita potovanja po kopnem in morju, vojni pohodi in zabavne prigode barona Münchhausna ali po naše Lažnivega Kljukca, kakor jih sam pripoveduje svojim prijateljem ob čaši vina* ali krajše Lažnivi Kljukec.